

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Biología Vegetal I



**ANÁLISIS MOLECULAR DE LAS PROTEÍNAS VIRALES
IMPLICADAS EN LA TRANSMISIÓN POR PULGONES DEL
VIRUS DE LA SHARKA (PLUM POX VIRUS)**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Belén Martínez García

Bajo la dirección del doctor

Dionisio López Abella

Madrid, 2000

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL I**



**ANÁLISIS MOLECULAR DE LAS PROTEÍNAS VIRALES
IMPLICADAS EN LA TRANSMISIÓN POR PULGONES
DEL VIRUS DE LA SHARKA (PLUM POX VIRUS)**

TESIS DOCTORAL

BELÉN MARTÍNEZ GARCÍA

Madrid, 2000

23945



T23945

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL I

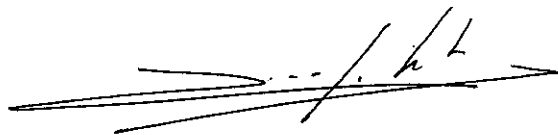
**ANÁLISIS MOLECULAR DE LAS PROTEÍNAS VIRALES
IMPLICADAS EN LA TRANSMISIÓN POR PULGONES
DEL VIRUS DE LA SHARKA (PLUM POX VIRUS)**



618129201
12477943X

Memoria presentada para optar al
grado de Doctor en Ciencias Biológicas por
BELÉN MARTÍNEZ GARCÍA

Vº Bº Director de la Tesis:



Dr. Dionisio López Abella
Profesor de Investigación
Centro de Investigaciones Biológicas
Consejo Superior de Investigaciones Científicas



Belén Martínez García

ÍNDICE

RESUMEN	IV
ABREVIATURAS	VI
AGRADECIMIENTOS	XI

I. INTRODUCCIÓN.

I.1. LOS POTYVIRUS	1
I.1.1 EL GÉNERO POTYVIRUS	2
I.1.1.1. Estructura y organización genómica	2
I.1.1.2. Expresión genómica: procesamiento de la poliproteína viral	3
I.1.2. TRANSMISIÓN DE POTYVIRUS EN LA NATURALEZA	7
I.1.2.1. Transmisión de virus de plantas por organismos vectores	7
I.1.2.2. Transmisión de virus de plantas por pulgones	8
I.1.2.3. Transmisión de potyvirus por pulgones	9
I.1.2.3.1. El componente "helper" en la transmisión de potyvirus por pulgones	9
I.1.2.3.2. La proteína de la cápsida en la transmisión de potyvirus por pulgones	11
I.1.2.3.3. Hipótesis del proceso de transmisión de potyvirus por pulgones	12
I.2. EL VIRUS DE LA SHARKA	13

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS..... 17

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. AISLADOS VIRALES	19
III.2. PLÁSMIDOS	19
III.3. PLANTAS DE ENSAYO	20
III.4. INOCULACIÓN DE VIRUS EN LAS PLANTAS	21
III.5. TRANSMISIÓN POR PULGONES	21
III.6. PURIFICACIÓN DE VIRUS	22
III.7. PURIFICACIÓN PARCIAL DEL HC	23
III.7.1. Purificación de HC de PVY	23
III.7.2. Purificación de HC de PPV	23
III.8. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO	24
III.9. ANÁLISIS SEROLÓGICO	24
III.9.1. Inmunoelectrotransferencia (Western blot)	24
III.9.2. ELISA DASI	25
III.9.3. Obtención de anticuerpos policlonales frente al HC de PPV	25
III.9.3.1. Clonaje de HC de PPV en el plásmido de expresión pMal-p2	25
III.9.3.2. Expresión de la proteína de fusión MBP-HC PPV	26
III.9.3.3. Purificación de la proteína de fusión MBP-HC	27
III.9.3.4. Inmunización del conejo con proteína HC	27
III.9.3.5. Inmunoadsorción del suero anti-HC de PPV	28
III.9.3.5.1. Preparación de polvo acetónico	28
III.9.3.5.2. Inmunoadsorción	28

III.10. ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN CP-HC EN MEMBRANA DE NITROCELULOSA	28
III.11. AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	29
III.11.1. Extracción de ARN viral	29
III.11.2. Inmunocaptura de virus (IC)	30
III.11.3. Transcripción inversa (RT)	30
III.11.4. Amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	30
III.12. CLONAJE DE LOS GENES HC Y CP DE PPV EN EL PLÁSMIDO pBS	31
III.12.1. Cebadores y amplificación por RT/PCR	31
III.12.2. Clonaje en el plásmido vector pBluescript	32
III.12.3. Determinación y comparación de secuencias	33
III.13. CLONAJE DE GENES HC CORRESPONDIENTES A LOS AISLADOS PPV3 Y 5.15 EN CLONES DE GENOMA COMPLETO DE PPV	33
III.14. CONSTRUCCIÓN DE QUIMERAS DE PPV QUE CONTIENEN EL GEN HC DE LOS AISLADOS PVY-0AT Y PVY-0NAT	35
III.15. INOCULACIÓN DE PLANTAS CON CONSTRUCCIONES VIRALES	38
III.15.1. Transcripción <i>in vitro</i> de ARN viral	38
III.15.2. Inoculación de transcritos de ARN en planta	38
III.15.3. inoculación de ADN purificado en planta	38
III.16. ANÁLISIS DE LA PROGENIE VIRAL EN PLANTAS INFECTADAS	39
III.16.1. Confirmación de las construcciones virales	39
III.16.2. Análisis de acumulación de las quimeras de PPV en planta	40

IV. RESULTADOS

IV.1. PURIFICACIÓN DE AISLADOS DE PPV. ANÁLISIS DE LAS PARTÍCULAS VIRALES POR ELECTROFORESIS, WESTERN BLOT Y MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	41
IV.2. TRANSMISIÓN DE AISLADOS DE PPV	43
IV.2.1. Transmisión planta a planta	43
IV.2.2 Transmisión a través de membrana	43
IV.3. PURIFICACIÓN PARCIAL DEL HC DE PPV	45
IV.4. PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES PARA LA PROTEÍNA HC DE PPV	46
IV.5. ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN CP-HC EN MEMBRANA DE NITROCELULOSA	47
IV.6. CLONAJE Y SECUENCIACIÓN DEL GEN HC DE AISLADOS ESPAÑOLES DE PPV	48
IV.7. CLONAJE Y SECUENCIACIÓN DEL GEN CP DE AISLADOS ESPAÑOLES DE PPV	59

IV.8. CLONAJE DE LOS GENES HC DE LOS AISLADOS PPV 3.3 Y 5.15 EN CLONES DE GENOMA COMPLETO DE PPV.....	63
IV.8.1. Sustitución de la región HC de los clones pR3 y pNAT por la correspondiente de los aislados PPV 3.3 y PPV 5.15.	63
IV.8.2. Comprobación “marcha atrás” para los clones pR3 y pNAT que contienen la secuencia HC de los aislados PPV 3.3 y PPV 5.15	65
IV.8.3. Comprobación de “marcha adelante” para los clones pR3 y pNAT que contienen la secuencia HC de los aislados PPV 3.3 y PPV 5.15	66
IV.9.. TRANSMISIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES EN CLONES COMPLETOS DE PPV	68
IV.10. CONSTRUCCIÓN DE LAS QUIMERAS PPV-HC PVY	70
IV.11. TRANSMISIÓN POR PULGONES DE LAS CONSTRUCCIONES QUIMÉRICAS	75
V. <i>DISCUSIÓN</i>	77
VI. <i>CONCLUSIONES</i>	90
VII. <i>BIBLIOGRAFÍA</i>	92

Resumen

En el presente trabajo de tesis se ha abordado el estudio del proceso de transmisión de los potyvirus por pulgones centrándonos en dos proteínas virales implicadas en dicho proceso: la proteína de la cápsida (CP) y el factor de adquisición (HC).

Se han analizado las secuencias que codifican la CP y el HC de dos aislados españoles del potyvirus denominado virus de la Sharka o Plum Pox Virus (PPV), obtenidos de muestras de campo y designados como PPV 5.15 y PPV 3.3. El aislado PPV 3.3 se caracteriza por su ausencia de transmisión por pulgones así como por poseer una CP alterada. Esta CP presenta una delección de quince aminoácidos en su extremo amino terminal, delección que afecta a un motivo DAG altamente conservado en potyvirus mediante el cual parece ocurrir una unión CP-HC imprescindible para que tenga lugar la transmisión del virus por pulgones.

Trabajos previos con PPV 3.3 y experimentos actuales con otro aislado de similares características (PPV R3-NAT) demuestran que estos virus son transmitidos por pulgones en ensayos *in vitro* en los que el pulgón se alimenta de una solución que contiene virus purificado junto con un HC funcional de otro potyvirus, el virus Y de la patata (PVY). Estos resultados demuestran la interacción CP-HC heterólogo en condiciones *in vitro* posibilitando la transmisión.

Recientemente se ha podido comprobar la interacción de CP de PPV 3.3 así como de PPV 5.15 con HC purificado de ambos aislados mediante experimentos en los que la CP de PPV se encuentra "adherida" a una membrana de nitrocelulosa que es incubada con una solución de HC de PPV purificado de PPV.

Por tanto, la CP de PPV 3.3 es capaz de unirse *in vitro* a HC purificado heterólogo así como al homólogo, de modo que la falta de transmisión por pulgones de este aislado debería buscarse en otro aspecto. En este sentido hay que tener en cuenta que en el proceso de transmisión el HC se une no sólo a la CP del virus, sino también al estilete del pulgón, de modo que podría ocurrir que el HC de PPV 3.3 tuviese alguna alteración que no permitiera dicha unión. El análisis de la secuencia del HC de PPV 3.3 así como de PPV 5.15 ha puesto de manifiesto una alta heterogeneidad poblacional de secuencia para ambos aislados. El efecto de estos resultados sobre la actividad de transmisión del HC de PPV 3.3 es discutido en el trabajo.

En la línea de estudio de la transmisión heteróloga en potyvirus se realizaron quimeras del genoma de un aislado de PPV (PPV Rankovik) en donde se sustituyó la región codificadora del HC por la correspondiente de los aislados PVY 0AT (transmisibile por pulgones) y PVY 0NAT (no transmisibile). Las construcciones, designadas como pQ-0AT y pQ-0NAT, resultaron infectivas en planta si bien su transmisión por pulgones fue negativa. Por tanto el HC de PVY en un contexto de genoma de PPV es capaz de realizar todas las funciones que posibilitan la infección viral, como son la replicación, el movimiento a larga distancia, la expresión de síntomas o el procesamiento de la poliproteína viral, pero no puede llevar a cabo la transmisión de los virus quiméricos. Las causas de este comportamiento diferente del HC de PVY con respecto a la transmisión de PPV dependiendo de si interviene en el proceso como una proteína purificada o como parte integrante del genoma viral de PPV son discutidas en esta tesis.

Por otra parte, se ha conseguido por primera vez la purificación parcial del HC de PPV gracias a la obtención previa de anticuerpos policlonales frente a esta proteína que nos han permitido el seguimiento de la misma durante el proceso de purificación. Tanto el HC purificado de PPV como los anticuerpos policlonales posibilitaron los citados experimentos de interacción CP-HC de PPV.

Abreviaturas de virus.

(Según Mathews, 1979)

Familia Potyviridae, género Potyvirus

PeMoV	Virus del moteado del pimiento (Pepper mottle virus)
PPV	Virus de la viruela del ciruelo (Plum Pox Virus)
PVC	Virus C de la patata (Potato virus C)
PVY	Virus Y de la patata (Potato virus Y)
TEV	Virus del grabado del tabaco (Tobacco etch virus)
TuMV	Virus del mosaico del nabo (Turnip mosaic virus)
TVMV	Virus del moteado de las venas del tabaco (Tobacco vein mottle virus)
ZYMV	Virus del mosaico amarillo del calabacín (Zucchini yellow mosaic virus)

Familia Bromoviridae, género Potexvirus

PAMV	Virus del mosaico aucuba de la patata (Potato aucuba mosaic virus)
PVX	Virus X de la patata (Potato virus X)

Familia Togaviridae, género Tobamovirus

TMV	Virus del mosaico del tabaco (Tobacco mosaic virus)
-----	---

Familia Papovaviridae, género Caulimovirus

CaMV	Virus del mosaico de la coliflor (Cauliflower mosaic virus)
------	---

Abreviaturas.

μg	Microgramo
μl	Microlitro
A	Adenina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Amp	Ampicilina
AMV-RT	Transcriptasa reversa del virus de la mieloblastosis de aves
AP	Fosfatasa Alcalina
ARN	Ácido ribonucleico
BSA	Albúmina de suero bovino
°C	Grados centígrados
C	Citosina
CI	Proteína de las inclusiones cilíndricas
CP	Proteína de la cápsida viral
DIECA	Dietilditiocarbamato
dNTP	5' Desoxinucleósido trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EGTA	Etilenglicol-bis (β-aminoetileter) N', N', N', N'-tetracético
ELISA	Ensayo inmunoenzimático (Enzyme-linked immunosorbent assay)
ELISA-DASI	ELISA indirecto doble sandwich de anticuerpos
g	Fuerza centrífuga relativa
G	Guanina
gr	Gramo
h	Hora
HC	Factor de adquisición o transmisión
IC	Inmunocaptura
IPTG	Isopropyl-β-thiogalactopyranosido
KDa	Kilodalton
LB	Medio Luria-Bertani
M	Molar (moles/litro)
mA	Miliamperios
MAb	Anticuerpo monoclonal
MBP	Proteína de unión a la maltosa
MES	Morfolín-etil-sulfónico
mg	Miligramo
ml	Mililitro
NAT	No transmisible por pulgones
NIa	Proteína "a" de las inclusiones nucleares
NIb	Proteína "b" de las inclusiones nucleares
nt	Nucleótido
p/v	Peso/volumen
P1-Pro	Proteasa P1
P3	Proteína P3

PAb	Anticuerpo policlonal
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	0.015 M Na ₂ HPO ₄ , 0.15 M ClNa, pH 7.4
PBST	PBS con 0.05% de Tween-20
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
pMal	vector de clonaje para expresión y purificación proteica en <i>E. coli</i>
PMSF	Fenilmetilsulfonilo fluoruro
PVP	Polivinilpirrolidona
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcripción inversa
SDS	Dodecilsulfato sódico
seg	Segundo
T	Timina
TBE	0.045 M Tris-borato, pH 8, 1mM EDTA
U	Uracilo
VPg	Proteína unida al genoma viral

Aminoácidos

Aminoácido	Abreviatura		Peso molecular	Hidrofobicidad Hidro-	Carga
	3 letras	1 letra			
Alanina	Ala	A	89	-fóbico	0
Arginina	Arg	R	174	-fílico	+
Asparagina	Asn	N	132	-fílico	0
Ácido aspártico	Asp	D	133	-fílico	-
Ác. glutámico	Glu	E	147	-fílico	-
Cisteína	Cys	C	121	-fílico	0
Fenilalanina	Phe	F	165	-fóbico	0
Glutamina	Gln	Q	146	-fílico	0
Glicina	Gly	G	75	-fílico	0
Histidina	His	H	155	-fílico	+
Isoleucina	Ile	I	131	-fóbico	0
Leucina	Leu	L	131	-fóbico	0
Lisina	Lys	K	146	-fílico	+
Metionina	Met	M	149	-fóbico	0
Prolina	Pro	P	115	-fóbico	0
Serina	Ser	S	105	-fílico	0
Treonina	Thr	T	119	-fílico	0
Triptófano	Trp	W	204	-fóbico	0
Tirosina	Tyr	Y	181	-fílico	0
Valina	Val	V	117	-fóbico	0

Código genético

1ª posición (5')	2ª posición								3ª posición (3')
	U		C		A		G		
U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys	U
	UUC	Phe	UCC	Ser	UAC	Tyr	UGC	Cys	C
	UUA	Leu	UCA	Ser	UAA	Ter	UGA	Ter	A
	UUG	Leu	UCG	Ser	UAG	Ter	UGG	Trp	G
C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg	U
	CUC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg	C
	CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg	A
	CUG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg	G
A	AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser	U
	AUC	Ile	ACC	Thr	AAC	Asn	AGC	Ser	C
	AUA	Ile	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg	A
	AUG	Met	ACG	Thr	AAG	Lys	AGG	Arg	G
G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly	U
	GUC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gly	C
	GUA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly	A
	GUG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly	G

Agradecimientos

Esta tesis ha sido realizada en el Centro de Investigaciones Biológicas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas bajo la dirección del Profesor Dionisio López Abella con la financiación de una beca del Plan Nacional de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Educación y Cultura.

INTRODUCCIÓN

1. LOS POTYVIRUS

Los potyvirus deben su nombre a su miembro tipo, el virus Y de la patata, en inglés "Potato virus Y" (PVY) y forman el mayor de los 34 grupos o familias de virus de plantas descritos hasta la fecha, conteniendo al menos 180 miembros entre definitivos y posibles, lo cual representa el 30% de los virus de plantas conocidos (Ward y Shukla, 1991).

La familia *Potyviridae* agrupa varios géneros que se diferencian entre sí principalmente por su modo de transmisión en la naturaleza. El género *Potyvirus* se integra por virus transmitidos por pulgones, los *Bymovirus* se transmiten por hongos y los *Rymovirus* por ácaros. Otros dos géneros se han propuesto como pertenecientes a esta familia: el género *Ipomovirus* (Barnett, 1991 y 1992) y los *Macluravirus* (Mowat *et al.*, 1991; Badge *et al.*, 1997) transmitidos por mosca blanca y pulgones, respectivamente.

Una característica común a todos los miembros de la familia *Potyviridae* es la capacidad de inducir en las células del huésped la aparición de inclusiones citoplasmáticas cilíndricas que en sección transversal semejan aspas de molino ("pinwheels") (Rubio Huertos y López-Abella, 1966; Hollings y Brunt, 1981) y cuya variable morfología tiene importancia taxonómica (Edwardson, 1992). En algunos miembros de la familia se han descrito además otros tipos de inclusiones, como las amorfas del citoplasma o las cristalinas del núcleo (Christie y Edwardson, 1977; Rubio-Huertos, 1978), cuya presencia y morfología son también criterios de clasificación para los miembros de esta familia (Edwardson, 1992).

Todos los potyvirus presentan partículas virales alargadas y flexuosas, con un tamaño que oscila entre 600 y 950 nm de longitud y 12 a 15 de diámetro. La partícula se compone por una molécula de ARN monocatenario de unas 10 Kb y polaridad positiva rodeada por unas 2.000 copias de la proteína de la cápsida (CP) (Riechmann *et al.*, 1992), con excepción de los bymovirus que presentan un genoma dividido en dos fragmentos (Edwardson, 1992). El ARN lleva unida covalentemente una proteína VPg en su extremo 5' (Hari, 1981; Siaw *et al.*, 1985; Riechmann *et al.* 1989 y 1992; Murphy *et al.*, 1990) y una cola de poliadenina en el 3' (Hari *et al.*, 1979) (figura 1). La expresión genómica implica la síntesis de una poliproteína que posteriormente se autoprocesa para dar lugar a los productos virales (Riechmann *et al.*, 1992).

Las características de estructura así como de organización y expresión genómica de los potyvirus son muy similares a las de los picornavirus de animales. Esto ha hecho que la familia *Potyviridae* se incluya dentro del

supergrupo de los virus de plantas de ARN de polaridad positiva tipo Picorna (Goldbach, 1987).

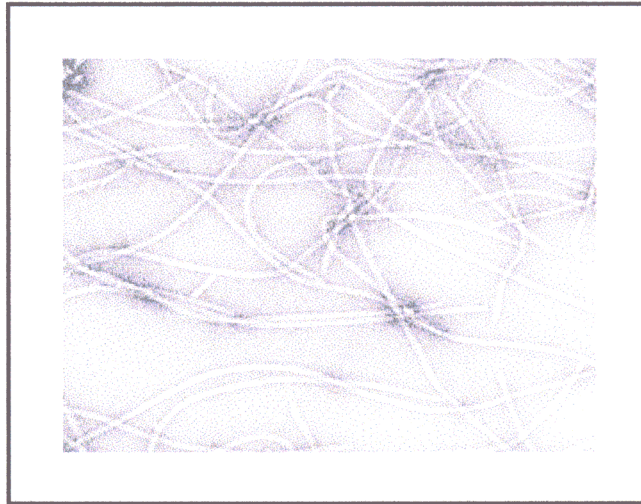


Figura 1. Partículas virales de los potyvirus. Tinción negativa de una preparación del aislado PPV 5.15 purificado.

1.1. EL GÉNERO POTYVIRUS

1.1.1. Estructura y organización genómica

El ARN de los potyvirus contiene una única fase de lectura abierta flanqueada por regiones no codificantes que se traduce en una poliproteína de aproximadamente 350 kDa y cuyo procesamiento por proteasas virales dará lugar a los productos finales (Riechmann *et al.*, 1992).

En la región no codificadora del extremo 5', de unos 200 nucleótidos, aparecen algunos bloques de nucleótidos conservados entre diferentes potyvirus (Lain *et al.*, 1989; Turpen *et al.*, 1989). Esta región podría jugar un papel importante en procesos del ciclo viral como la encapsidación, traducción o replicación genómica (Lain *et al.*, 1989; Carrington y Freed, 1990; Wu y Shaw, 1998), aunque no parece existir una estructura secundaria conservada (Turpen *et al.*, 1989). En el extremo 3' del ARN viral aparece una región no codificadora mucho más heterogénea en tamaño, secuencia y estructura secundaria (Lain *et al.*, 1988; Turpen, 1989; Quemada *et al.*, 1990a y b).

La región 3' no codificadora interacciona con la replicasa viral durante el inicio de la síntesis de la cadena de ARN de sentido negativo y ofrece protección frente a la degradación exonucleotídica (Bryan *et al.*, 1992; Dolja y Carrington, 1992). Se ha demostrado que esta región tiene efecto sobre la expresión de síntomas en plantas infectadas con el potyvirus de las venas moteadas del tabaco (TVMV) (Rodríguez Cerezo *et al.*, 1991) y recientemente se ha comprobado su implicación directa en la replicación genómica (Haldemann *et al.*, 1998).

1.1.2. Expresión genómica: procesamiento de la poliproteína viral

El procesamiento de la poliproteína viral da lugar a nueve productos génicos que, a partir del extremo amino terminal, son: **P1-Pro**, factor de transmisión (**HC-Pro**), **P3**, **6k₁**, proteína de las inclusiones cilíndricas (**CI**), **6k₂**, proteína "a" de las inclusiones nucleares (**NIa**), proteína "b" de las inclusiones nucleares (**NIb**) y proteína de la cápsida (**CP**) (figura 2).

El procesamiento de la poliproteína se lleva a cabo por al menos tres proteasas de origen viral: P1-Pro (capaz de autoprocesarse) (Carrington *et al.*, 1990; Verchot *et al.*, 1991; Yang *et al.*, 1998)), HC-Pro (también autoproteolítica) (Carrington *et al.*, 1989a y b) y NIa (procesa el resto de la poliproteína) (Carrington y Dougherty, 1987; Hellman *et al.*, 1988; García *et al.*, 1989 y 1990).

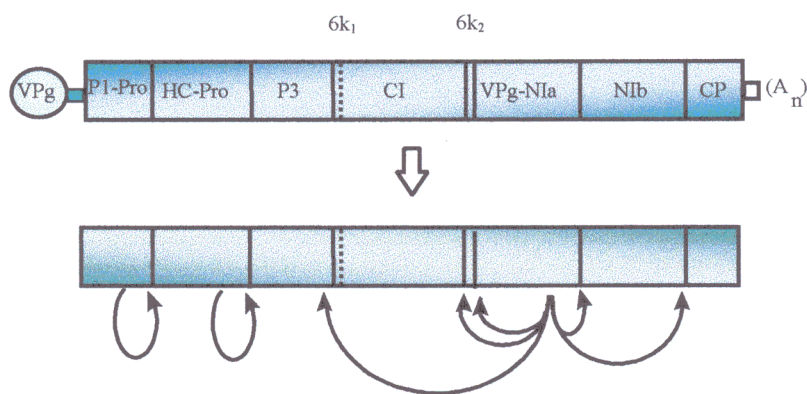


Figura 2. Organización genómica de potyvirus y procesamiento de la poliproteína viral. Las flechas indican los puntos de procesamiento sobre los que actúan las proteasas virales.

La proteasa NIa muestra una actuación diferencial sobre los puntos de corte de la poliproteína de manera que algunos intermediarios tardan más en

procesarse que otros, pudiendo ocurrir que algunos de estos precursores tuvieran funciones diferentes a las de sus productos finales (Dougherty *et al.*, 1989; Dougherty y Parks, 1989). También podría ser que los potyvirus tuvieran un sistema de control de expresión de productos génicos basado en procesamiento diferencial de los intermediarios (Dougherty *et al.*, 1989).

P1-Pro. Esta proteína de 28 a 34 kDa fue detectada *in vivo* en plantas de tabaco infectadas por el virus de las venas moteadas del tabaco (TVMV) (Rodríguez-Cerezo y Shaw, 1991). Presenta actividad proteasa en su extremo carboxilo que cataliza su separación del resto de la poliproteína, pudiendo estar implicado en este proceso algún cofactor de la planta (Mavankal y Rhoads, 1991; Verchot *et al.*, 1991, 1992).

Se ha propuesto que la proteína P1 podría estar involucrada en el movimiento de virus célula a célula (Domier *et al.*, 1987; Riechmann *et al.*, 1992; Brantley y Hunt, 1993), si bien otros trabajos sugieren para P1 un papel como factor accesorio en la estimulación de la amplificación genómica (Verchot y Carrington, 1995). Recientemente se la ha encontrado asociada a las inclusiones citoplásmicas formadas por la proteína CI (Arbatova *et al.*, 1998).

HC-Pro. El factor de transmisión o componente "helper" es una proteína multifuncional de 48 a 58 kDa que se ha sugerido podría formar depósitos insolubles en el citoplasma de la célula infectada, dando lugar a las inclusiones amorfas que inducen algunos potyvirus (De Mejía *et al.*, 1985; Baunoch *et al.*, 1990).

El factor HC-Pro presenta en su región carboxilo un dominio tiol-proteasa que le confiere capacidad autoproteolítica (Carrington *et al.*, 1989a; Oh y Carrington, 1989). En su región amino se ha descrito un posible lugar de glicosilación (Laín *et al.*, 1989) así como una región rica en residuos de Cys que podría formar estructuras similares a los denominados dedos de zinc (Robaglia *et al.*, 1989) a los que se atribuye un papel funcional (Berg, 1990).

La proteína HC-Pro interviene en el proceso de transmisión de potyvirus por pulgones en la naturaleza, siendo esta su función más estudiada (Maia *et al.*, 1996). Otros procesos en los que parece intervenir son la replicación viral (Atreya *et al.*, 1992; Atreya y Pirone, 1993; Cronin *et al.*, 1995; Kasschau y Carrington, 1995; Kasschau *et al.*, 1997; Andrejeva *et al.*, 1999), expresión de síntomas (Atreya *et al.*, 1992; Atreya y Pirone, 1993; Legavre *et al.*, 1996), movimiento a larga distancia del virus en la planta (Cronin *et al.*, 1995; Kasschau *et al.*, 1997), movimiento célula a

célula (Rojas *et al.*, 1997). El factor HC es capaz de interactuar con ácidos nucleicos (Maia y Bernardi, 1996; Merits *et al.*, 1998), de producir efecto sinérgico y activación *in trans* de la replicación de otros virus (Vance *et al.*, 1995; Pruss *et al.*, 1997; Shi *et al.*, 1997) y de inducir el fenómeno de inhibición del mecanismo de silenciamiento génico postranscripcional en la planta huésped (Anandalakshmi *et al.*, 1998; Brigneti *et al.*, 1998; Kasschau y Carrington, 1998).

P3-6K₁. La proteína P3 ha sido identificada como una proteína de 37 a 42 kDa, lo cual podría corresponder a las formas P3 y P3-6K₁, ya que el procesamiento entre P3 y 6K₁ parece ser poco eficiente (Riechmann *et al.*, 1992).

La función de estas proteínas no está aún bien determinada; se ha sugerido que la proteína P3, de secuencia poco conservada, podría actuar como cofactor durante el procesamiento de la poliproteína (Riechmann *et al.*, 1992), así como intervenir en la replicación viral (Rodríguez Cerezo *et al.*, 1993; Klein *et al.*, 1994). El extremo 3' de P3 es uno de los dos determinantes genéticos responsables del marchitamiento de plantas de tabasco (*Capsicum frutescens* L. var. Tabasco) por la infección con TEV (Chu *et al.*, 1997).

El péptido 6K₁ no ha sido identificado *in vivo* pero su secuencia y posición en la poliproteína sugieren que podría ser análoga al péptido 2B de picornavirus (Laín *et al.*, 1989) que está involucrado en el proceso de replicación del ARN viral (Johnson y Sarnow, 1991).

Proteína de las inclusiones cilíndricas (CI). Esta proteína, de unos 70 kDa, funciona como ARN helicasa viral (Laín *et al.*, 1990 y 1991), presentando un dominio de unión a nucleótidos trifosfato (NTPs) así como actividad NTPasa (Domier *et al.*, 1987; Gorbalenya y Koonin, 1989 y 1993; Laín *et al.*, 1989; Carrington *et al.*, 1998).

La proteína CI forma inclusiones citoplasmáticas cilíndricas o "pinweels" y se ha comprobado que interviene en el movimiento célula a célula del virus en la planta (Carrington *et al.*, 1998), siendo capaz de asociarse a la membrana plasmática y plasmodesmos (Lessemann, 1988; Rodríguez Cerezo *et al.*, 1997; Roberts *et al.*, 1998) así como a viriones (Langenberg, 1986). Esta proteína podría estar implicada en otras funciones como la unión del complejo de replicación a membranas celulares (Domier *et al.*, 1987).

6K₂. Este péptido parece ser análogo al péptido 3B de picornavirus, capaz de unirse a membrana (Giachetti y Semler, 1991). El hecho de que además se haya encontrado asociado a fracciones membranosas (Restrepo Hartwig y Carrington, 1993) sugiere que podría intervenir en el anclaje del complejo replicativo a la membrana (Restrepo Hartwig y Carrington, 1994).

Proteína "a" de las inclusiones nucleares (NIa). Esta proteína, de 49 a 52 kDa, se localiza principalmente en el núcleo de las células, lo cual implica que contiene señales para su transporte desde el citoplasma (Restrepo *et al.*, 1990; Restrepo Hartwig y Carrington, 1992 y 1993; Carrington *et al.*, 1993). En algunos potyvirus forma inclusiones nucleares que posiblemente se correspondan con un depósito del excedente de proteína (Knuhtsen *et al.*, 1974; Dougherty y Hiebert, 1980).

La actividad proteolítica de la proteína NIa reside en su extremo carboxilo, mientras que el extremo amino se corresponde con la proteína VPg (Dougherty y Parks, 1991). La actividad proteasa (tipo serina) procesa la poliproteína viral actuando en *cis* y *trans* con diferente eficiencia sobre los diferentes puntos de corte específicos, salvo los autoprosesados por P1-Pro y HC-Pro (Carrington y Dougherty, 1988; Dougherty *et al.*, 1988 y 1989; García *et al.*, 1989a y b; Carrington *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 1996 y 1998).

NIa procesa con baja eficiencia (Dougherty y Parks, 1991) su propio extremo amino, liberando la proteína VPg (22 a 24 kDa). La VPg protege el extremo 5' del ARN viral uniéndose a él covalentemente (Murphy *et al.*, 1990) y podría estar implicada en el inicio de la replicación viral (Riechmann *et al.*, 1992; Murphy *et al.*, 1996), transporte subcelular y movimiento a corta y larga distancia del virus en la planta (Schaad *et al.*, 1996 y 1997; Nicolas *et al.*, 1997). NIa interacciona con la proteína NIb por medio del dominio VPg (Li *et al.*, 1997), siendo posible que esta última estimule la actividad ARN polimerasa de la NIb (Fellers *et al.*, 1998).

Proteína "b" de las inclusiones nucleares (NIb). Proteína de unos 58 kDa, que al igual que la NIa se dirige al núcleo donde forma depósitos (Li y Carrington, 1993).

La proteína NIb interviene en la replicación viral como ARN polimerasa dependiente de ARN, mostrando una alta homología de secuencia con otras polimerasas (Domier *et al.*, 1987; Robaglia *et al.*, 1989; Hong y Hunt, 1996).

Proteína de la cápsida (CP). Esta proteína, de entre 30 y 37 kDa, consta de una región central conservada y de extremos amino y carboxilo variables en longitud y secuencia que se localizan en la superficie de la partícula (Allison *et al.*, 1985; Dougherty *et al.*, 1985; Shukla *et al.*, 1988).

La región central está involucrada en la encapsidación del genoma viral (Shukla y Ward, 1989), mientras que la región amino terminal resulta esencial para la transmisión de potyvirus por pulgones (Pirone, 1991; Atreya *et al.*, 1995; Blanc *et al.*, 1997).

La proteína de la cápsida interviene en el movimiento de virus en la planta a corta y larga distancia (Dolja *et al.*, 1994 y 1995; Rojas *et al.*, 1997; Andersen y Johansen, 1998; López-Moya y Pirone, 1998). El ARN codificante de la CP parece que interviene en la replicación viral (Mahajan *et al.*, 1996; Haldemann Cahill *et al.*, 1998).

1.2. TRANSMISIÓN DE POTYVIRUS EN LA NATURALEZA

Los potyvirus, y los virus de plantas en general, son parásitos obligados que deben transmitirse de un huésped a otro para asegurar su supervivencia. Los mecanismos que se utilizan para ello se pueden diferenciar según empleen o no un organismo vector en el proceso. Así, encontramos **transmisión sin intervención de organismos vectores** cuando el virus es capaz de propagarse por semillas, polen, tejidos de propagación vegetativa (bulbos, tubérculos) o heridas en el tejido vegetal y **transmisión por medio de organismos vectores** cuando se desarrolla una asociación específica vector-virus que posibilita la propagación de este último, siendo el mecanismo de transmisión más extendido y efectivo.

1.2.1. Transmisión de virus de plantas por organismos vectores

La mayor parte de los organismos vectores son invertebrados, aunque algunos virus son transmitidos por hongos (de los géneros *Olpidium*, *Polimixa* y *Spongospora*) y en ciertas condiciones se puede conseguir infección de virus empleando bacterias fitopatógenas (*Agrobacterium*) (Mathews, 1991).

Los invertebrados incluyen los Filos *Nematoda* y *Artropoda*. En *Nematoda* el orden más importante en transmisión es *Dorylaimida*. En *Artropoda* los órdenes a destacar serían *Acari* (Clase *Arachnida*) y *Coleoptera*, *Thysanoptera*, *Hemiptera* y *Homoptera* (Clase *Insecta*). *Homoptera* es el orden cuyas especies pueden transmitir

mayor número de virus debido a las características de alimentación de sus miembros.

En el proceso de transmisión existen tres etapas diferenciadas: el período de adquisición el período de tiempo que transcurre hasta que el vector es capaz de adquirir el virus de la planta en la que se alimenta; el período de latencia sería el tiempo posterior que se necesita en ocasiones hasta que el vector es capaz de transmitir el virus. La capacidad de transmitir se mantiene durante el llamado período de retención.

Siguiendo los criterios de Harris (1991) y Gray (1996) la transmisión puede ser de **tipo circulativo** (el virus pasa a la hemolinfa y posteriormente a las glándulas salivares, liberándose con la saliva.) o **no circulativo** (cuando se asocia temporalmente con superficies del interior del tracto digestivo sin cruzar barreras celulares).

En la transmisión circulativa, durante este recorrido el virus se puede replicar en el interior del vector (**transmisión circulativa y propagativa**) o no (**transmisión circulativa no propagativa**). En cualquier caso, debido a que los virus se tienen que translocar dentro del vector, se necesita que transcurra un período de latencia para que pueda ocurrir la inoculación, lo cual ha hecho que a este tipo de transmisión se la considere además de tipo persistente.

En la transmisión de **tipo no circulativo** no es necesario un período de latencia y el vector pierde la capacidad de inoculación tras la muda. La transmisión no circulativa puede clasificarse en semipersistente y no persistente en función de la duración de los períodos de adquisición y retención. En la transmisión semipersistente la eficiencia de la transmisión aumenta al prolongar los tiempos de adquisición e inoculación y el vector mantiene su capacidad de transmitir durante horas e incluso días. En la transmisión no persistente la transmisión se ve favorecida si los tiempos de adquisición son cortos y si ha habido un ayuno previo. El vector retiene virus en forma infectiva por períodos cortos, de minutos a horas.

1.2.2. Transmisión de virus de plantas por pulgones

De los 650 virus vegetales entre miembros definitivos y posibles, más de 460 (71%) son transmitidos por insectos y de ellos casi 380 (58%) lo son por especies de *Homoptera*. Dentro de *Homoptera* los pulgones transmiten las tres cuartas partes de

los virus (Francki *et al.*, 1991), constituyendo el grupo más importante de vectores de virus de plantas (Eastop, 1977; Harris, 1991).

El ciclo de vida de los pulgones (Dixon, 1985) incluye un huevo de invierno que da lugar en primavera a una hembra partenogenética o fundatriz. A partir de esta hembra surgen sucesivas generaciones de hembras partenogenéticas (ápteras y aladas) que colonizan las especies huéspedes. El ciclo se puede cerrar con la aparición de formas sexúparas que generan formas sexuales encargadas de producir los huevos. En ocasiones las formas partenogenéticas son capaces de superar la estación desfavorable y el ciclo sólo es completado en determinadas condiciones ambientales.

Los pulgones disponen de un aparato bucal chupador que incluye el labro, el labium y un estilete, compuesto por dos mandíbulas y dos maxilas. Al acoplarse las maxilas determinan un canal alimenticio y un canal salivar (Forbes, 1977). El pulgón realiza inserciones breves de prueba en la planta, segregando saliva que rodea al estilete para facilitar su penetración en las células epidérmicas. Si el alimento fuera el adecuado el pulgón hará penetrar el estilete hasta el floema, pudiendo permanecer alimentándose largo tiempo (López-Abella y Bradley, 1969; López-Abella *et al.*, 1988). De este modo el pulgón adquiere el virus de una planta para posteriormente inocularlo cuando llegue a una nueva planta y repita el proceso de alimentación (López-Moya y López-Abella, 1996).

1.2.3. Transmisión de potyvirus por pulgones

La transmisión de potyvirus por pulgones es de tipo no circulativo y no persistente. Esto quiere decir que el pulgón es capaz de adquirir el virus en una inserción breve, de segundos a minutos, manteniendo la capacidad de transmitirlo por un tiempo también breve, de minutos a pocas horas, y pudiendo inocularlo inmediatamente tras la adquisición (Pirone, 1991; Gray, 1996). Como ya se ha comentado, en la transmisión intervienen dos proteínas virales, el factor de transmisión HC y la proteína de la cápsida.

1.2.3.1. El componente "helper" en la transmisión de potyvirus por pulgones

La participación de un componente viral distinto del virión en el proceso de transmisión de potyvirus fue puesta de manifiesto en trabajos con el potyvirus C de la patata (PVC) y el potexvirus del mosaico aucuba de la patata (PAMV), ocurriendo que ambos aislados eran incapaces de transmitirse por pulgones a menos que estuvieran acompañados del potyvirus Y de la patata (PVY) (Kassanis,

1961) o que los pulgones comieran previamente sobre planta infectada con PVY (Kassanis y Govier, 1971a). Posteriormente se comprobó que pulgones que se alimentaban de preparaciones de PVY purificado eran incapaces de transmitir virus si no se alimentaban previamente sobre hojas infectadas con PVY desactivado por irradiación con luz ultravioleta (Kassanis y Govier, 1971b). Parecía existir, por tanto, un factor ayudante HC cuya adquisición debía ocurrir a la vez o previamente a la de los viriones (Govier y Kassanis, 1974). Diversos estudios establecieron la naturaleza proteica (Govier *et al.*, 1977; Pirone, 1977; Thornbury *et al.*, 1985) y origen viral del HC (Hellmann *et al.*, 1983; Thornbury y Pirone, 1983), cuya forma activa parece ser un homodímero (Hellmann *et al.*, 1983; Thornbury *et al.*, 1985).

En el extremo amino terminal de la proteína aparece una región rica en cisteínas que se ha postulado que podría unir ciertos iones metálicos formando los llamados “dedos de zinc”, descritos para otras muchas proteínas no relacionadas en las que tienen papel funcional importante (Robaglia *et al.*, 1989; Berg, 1990). Sustituciones de algunos residuos altamente conservados de cisteínas e histidinas en esta región se traducen en la pérdida de transmisibilidad viral e incluso la inviabilidad del virus (Atreya y Pirone, 1993; Llave, 1999). Mutantes del TVMV con una delección en la porción amino terminal del HC no infectaban planta, mientras que mutantes de delección del TEV resultaban altamente infectivos, si bien perdían su capacidad de transmisión por vectores (Dolja *et al.*, 1992; Blanc *et al.*, 1998). Este diferente comportamiento podría deberse a que el extremo amino del HC estuviese implicado de un modo indirecto en la infectividad viral, que su secuencia nucleotídica interaccionase con componentes específicos del huésped que actuaran en el proceso de infección. En el caso del TVMV dicha secuencia estaría en el extremo amino de la proteína HC mientras que en el TEV se situaría en otra región, explicándose así el diferente efecto fenotípico (Atreya y Pirone, 1993).

La comparación de secuencias aminoacídicas de diversos potyvirus, transmisibles y no transmisibles, permitió identificar ciertos dominios y aminoácidos conservados que parecían estar implicados en transmisión. Dentro de la región rica en cisteínas del extremo amino terminal aparece un motivo KITC (Lys-Ile-Thr-Cys) cuya mutación se correlaciona con la falta de transmisibilidad de potyvirus. Aislados en los que de forma natural aparecen sustituciones del aminoácido Lys por Glu presentan pérdida de transmisibilidad (Thornbury *et al.*, 1990; Grumet *et al.*, 1992; Granier *et al.*, 1993; Canto *et al.*, 1995b; Legavre *et al.*, 1996). En el mismo sentido, trabajos de mutagénesis dirigida en clones de genoma completo de potyvirus han confirmado la importancia de la Lys dentro del motivo

KITC (Atreya *et al.*, 1992; Atreya y Pirone, 1993), sugiriendo además la necesaria presencia de un residuo básico en esta posición (Atreya y Pirone, 1993).

En la región amino terminal aparecen igualmente ciertos residuos, ajenos al motivo KITC, que resultan esenciales para la actividad del HC. El cambio de Gly por Asp en la posición 35 del HC de PVY-1 (Canto *et al.*, 1995), Gly por Glu en posición -1 con respecto al dominio KITC en el HC del virus del mosaico del nabo (TuMV) (Nakashima *et al.*, 1995) y Phe por Leu en posición 10 del HC de TEV (Blanc *et al.*, 1998) determinan la pérdida de transmisión por vector.

Entre la región central y el extremo carboxilo aparece un motivo PTK (Pro-Thr-Lys) que también parece esencial para la actividad del HC en transmisión. Aislados no transmisibles del ZYMV contenían un residuo Ala en lugar de Thr en este motivo (Granier *et al.*, 1993), que pasaba por tanto de ser PTK a ser PAK. El efecto de esta mutación fue comprobado reproduciéndola en el genoma de un aislado transmisible del ZYMV (Huet *et al.*, 1994). Se ha observado que la sustitución de Pro por Ala y Thr por Ser determina la pérdida de transmisibilidad del virus, mientras que el cambio de Lys por Glu no afecta la transmisión (Peng *et al.*, 1998). La mutación Thr por Ala en el genoma del TEV también implica la pérdida de transmisibilidad del virus (Blanc *et al.*, 1998).

1.2.3.2. La proteína de la cápsida (CP) en la transmisión de potyvirus por pulgones

El hecho de que aislados virales no transmisibles tuvieran, sin embargo, un HC funcional llevó a sugerir que la proteína de la cápsida viral podría estar también implicada en la transmisión virus (Pirone y Thornbury, 1983). La región amino terminal de la CP presenta, a pesar de su gran variabilidad, un triplete de aminoácidos Asp-Ala-Gly (DAG) altamente conservado entre potyvirus (Atreya *et al.* 1990, 1991; Gal-On *et al.*, 1992) y que queda expuesto en la superficie de la partícula viral (Shukla *et al.*, 1988). La alteración o eliminación de aminoácidos en este motivo determinan la pérdida parcial o total de la transmisibilidad del virus (Atreya *et al.*, 1990, 1991 y 1995), demostrándose su intervención en el proceso.

Existen mutantes con una delección de quince aminoácidos en la CP originada en el pase de los virus de su huésped leñoso natural a un huésped herbáceo. Este es el caso del aislado español PPV 3.3 en el cual se produjo la pérdida de quince aminoácidos del extremo amino terminal como consecuencia de su pase de plantas de ciruelo a *N. benthamiana* manualmente (López Moya *et al.*, 1995). La delección afecta al motivo DAG que pasa a convertirse en DAL a la vez que el aislado pierde su transmisibilidad por pulgones. Trabajos con PPV 3.3

demuestran que en ensayos de transmisión a través de membrana el virus es capaz de transmitirse cuando es suplementado con un HC purificado de un aislado transmisible de PVY (López-Moya *et al.*, 1995). El hecho de que aislados no transmisibles del tipo de PPV 3.3 sean capaces de transmitirse con un HC heterólogo plantearía la duda de si realmente la pérdida de transmisibilidad es debida a la alteración del motivo DAG o bien a alguna alteración paralela en el HC. Por otra parte también podría ocurrir que el HC heterólogo empleado en los ensayos de transmisión a través de membrana fuera capaz de interactuar con un dominio de la CP diferente al reconocido por el propio HC.

1.2.3.3. Hipótesis del proceso de transmisión de potyvirus por pulgones

Se han propuesto diversas hipótesis sobre el mecanismo de transmisión de virus por pulgones y sobre el papel que el HC jugaría en ese proceso. En una de ellas el HC permitiría la infección del virus en la planta, una vez que el pulgón lo hubiese liberado en la misma (Pirone y Kasanis, 1975). Otros autores presentan al HC como una proteína capaz de proteger al virus de las condiciones desfavorables del tracto digestivo del vector (López-Abella *et al.*, 1981). En otra hipótesis el HC modificaría el extremo amino de la CP de manera la partícula viral fuera capaz de unirse directamente al estilete del pulgón (Salomon y Bernardi, 1995). Pero la hipótesis más antigua sigue siendo la más aceptada y explica la actuación del HC a modo de un "puente" entre el virus y el vector, uniéndose por un lado a la CP del virus y por otro lado a los puntos de retención en el canal alimenticio del pulgón (Govier y Kassanis, 1974). Mediante técnicas de marcaje radiactivo y de inmunomarcaje se han podido detectar virus en el extremo distal del estilete así como en la epicutícula del canal alimenticio y en el intestino anterior, siempre y cuando el pulgón se hubiera alimentado de una solución de virus purificado conteniendo además HC (Berger y Pirone, 1986; Ammar *et al.*, 1994).

Esta hipótesis del "puente" implica la existencia de dominios de interacción entre HC y CP así como entre HC y vector. Trabajos de interacción *in vitro* parecen implicar al motivo DAG de la CP en la interacción con el HC, de modo que cuando el triplete DAG aparece modificado la interacción no ocurre (Blanc *et al.*, 1997). Estos trabajos han llegado incluso a proponer un péptido de 7 aminoácidos como el dominio mínimo para la interacción con el HC. Por su parte el HC parece interactuar con la CP por medio de su triplete PTK, viéndose afectada tal interacción por mutaciones en estos aminoácidos (Peng *et al.*, 1998). La unión del HC al estilete del pulgón ocurriría a través de su región amino terminal, estando posiblemente implicado el motivo KITC (Blanc *et al.*, 1998).

Una vez que el pulgón ha adquirido el virus debe ser capaz de liberarlos en una nueva planta. Nuevamente aparecen distintas hipótesis que intentan explicar como ocurre este proceso. La llamada hipótesis de "transporte en el estilete" (Kennedy *et al.*, 1962) propone que los virus se fijan al extremo del estilete y son liberados en una nueva planta durante las inserciones de prueba. La hipótesis de "ingestión-egestión" (Harris, 1977) supone que los viriones se adquieren durante la ingestión del contenido celular para posteriormente regurgitarlo en otra planta. La última hipótesis, de "ingestión-salivación" (Martin *et al.*, 1997) propone un papel activo de la salivación a la hora de liberar el virus, de modo que efectuaría una especie de arrastre de los virus que quedan retenidos en el extremo distal del canal alimenticio, ya que en ese punto el canal alimenticio y el canal salivar aparecen unidos. En cuanto a cómo ocurre esta liberación de los virus a nivel molecular se piensa que podría estar implicada la actividad proteasa del factor HC, que sería capaz de liberar la CP rompiendo su unión con ella, o bien también podría ocurrir que el extremo amino de la CP se digiriese con tripsinas de la saliva, separándose también en este caso del factor HC (Gray, 1996).

2. EL VIRUS DE LA SHARKA

La Sharka, que en búlgaro significa viruela, es el nombre con el que se conoce una enfermedad que afecta a los frutales de hueso y cuyo agente causal es un potyvirus, el llamado virus de la viruela del ciruelo, en inglés Plum pox virus (PPV) (Kegler y Schade, 1971). Esta enfermedad fue descrita por primera vez sobre ciruelo en Bulgaria en 1917. Actualmente la sharka se distribuye por toda Europa (Németh, 1994; Roy y Smith, 1994), norte de Africa (Wetzel *et al.*, 1991) y ha llegado a detectarse en Chile (Acuña, 1993) y la India (Thakur *et al.*, 1994) (tabla 1). En España la sharka se detectó por primera vez en 1984 en ciruelo japonés var. Red Beauty en cultivos en Sevilla, Murcia y Valencia (Llácer *et al.*, 1985); hoy en día la enfermedad se extiende a la Comunidad Valenciana, Cataluña, Baleares, Comunidad Andaluza, Aragón y Extremadura.

El virus de la sharka infecta diferentes especies frutales del género *Prunus*, de la subfamilia de las Prunoideas, siendo sus principales huéspedes naturales el ciruelo europeo (*Prunus domestica* L.), ciruelo japonés (*P. salicina* Lindl.), melocotonero (*P. persicae* (L.) Batsch.) y albaricoquero (*P. armeniaca* L.). El cerezo, tanto dulce como ácido (*P. avium* L. y *P. cerasus* L.), que se consideraba no susceptible (Dosba *et al.*, 1987), ha sido descrito también como huésped para PPV (Kalashyan *et al.*, 1994; Crescenzi *et al.*, 1995).

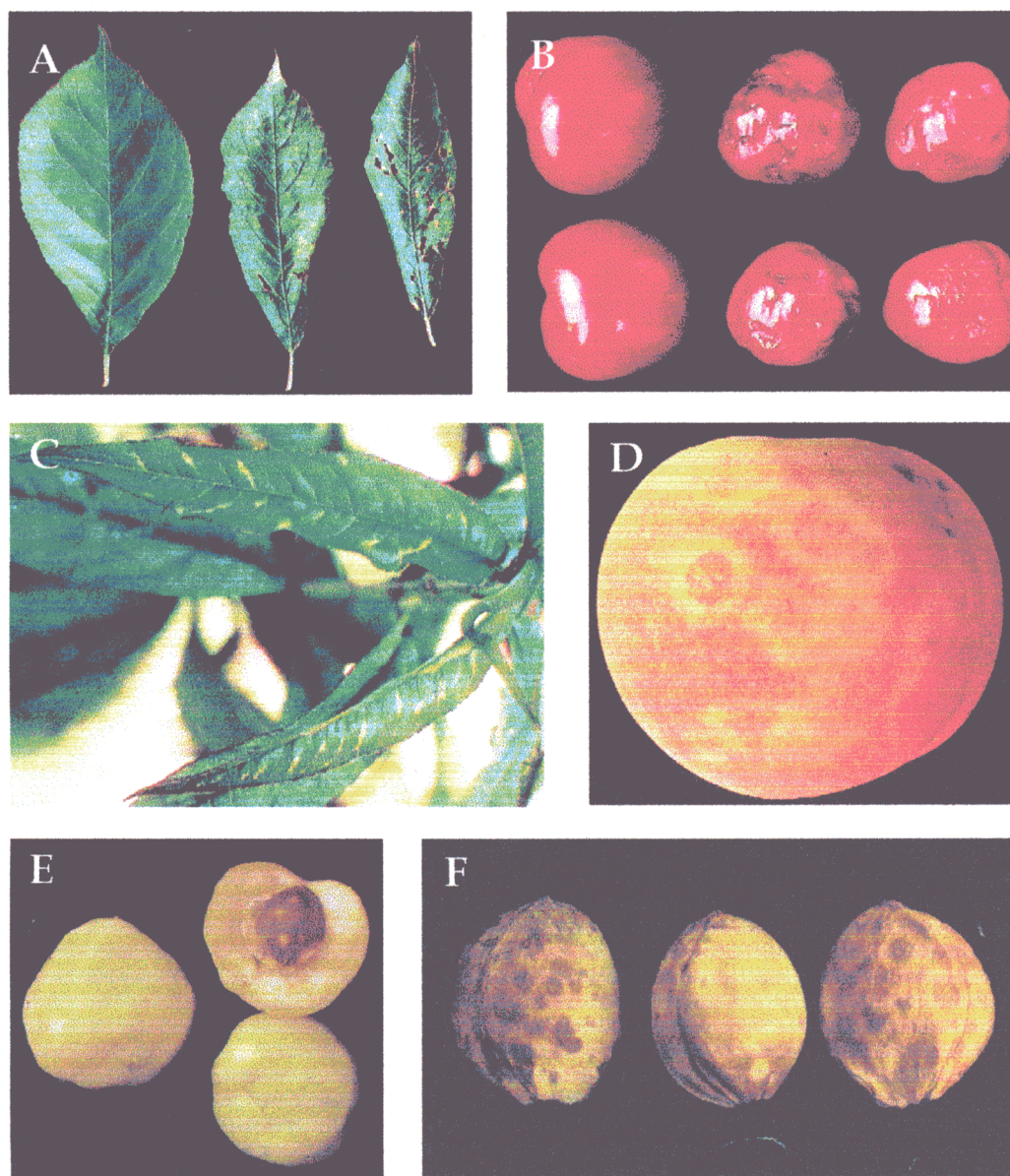


Figura 3. Síntomas de PPV en hojas y frutos de ciruelo, melocotonero y albaricoquero.

A. Hojas de ciruelo japonés sana (primera de la izquierda) y mostrando síntomas

B. Frutos sanos de ciruelo japonés (primeros de la izquierda) e infectados por PPV

C. Hojas de melocotonero mostrando síntomas de infección por PPV

D. Fruto de melocotonero infectado con PPV

E. Frutos de albaricoquero mostrando síntomas de infección por PPV en pulpa y hueso

F. Detalle de huesos de albaricoque mostrando anillos característicos de infección con PPV

Autor: IVIA - Editor: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

Los síntomas producidos por el virus de la sharka afectan tanto a las hojas de los frutales como a los propios frutos, haciéndoles perder su valor comercial tanto para el consumo directo como para el uso industrial. En las hojas pueden aparecer síntomas en forma de manchas cloróticas anulares (ciruelo) (figura 3A), amarilleo o clorosis en venas con deformación de la hoja (melocotonero) (figura 3C) y en ocasiones tanto manchas como venas cloróticas (albaricoquero, melocotonero con síntomas fuertes). En los frutos se pueden ver manchas anulares sobre la piel, deformaciones de la pulpa y, en casos más graves como el del albaricoquero, acorchado en la pulpa con aparición de anillos claros característicos en el hueso (figura 3). Todos estos síntomas van acompañados de una caída prematura de los frutos (Kegler y Schade, 1971).

El virus de la sharka infecta también plantas herbáceas, habiéndose descrito 106 especies huéspedes pertenecientes a más de siete familias (Németh, 1986). Estas plantas son muy útiles en trabajos de laboratorio para multiplicar el virus y como plantas indicadoras. Las más utilizadas para la propagación del virus son *Nicotiana benthamiana* Domin, *N. clevelandii* Gray y *Pisum sativum* L.. Como plantas indicadoras se emplean *Chenopodium foetidum* Schrad., *C. amaranticolor* Coste et Reyn. y *C. quinoa* Wild, en las cuales el virus produce lesiones locales.

Los síntomas de PPV en frutales se atenúan hasta su casi desaparición en invierno (EPPO/CABI, 1991). Esta característica de la infección de PPV, junto con el hecho de que el virus se distribuye de un modo irregular en la planta y de que su concentración puede disminuir, hace que en ocasiones no se detecte. De este modo el hombre puede participar en la propagación del virus por intercambio de material vegetal infectado. A este tipo de dispersión se le suma la transmisión natural del virus mediante pulgones que transmiten la enfermedad de unas plantas a otras. Se han descrito casi treinta especies de pulgones capaces de transmitir PPV en condiciones experimentales (Labonne *et al.*, 1994; Labonne *et al.*, 1995) y también se han realizado estudios de dinámica poblacional e identificación de pulgones vectores en condiciones naturales, analizando su presencia en campo a lo largo del año y su relación con la expansión de la enfermedad (Avinent *et al.*, 1989; Labonne y Lauriaut, 1991). Otro tipo de transmisión de PPV sería el asociado a semillas, pero aunque se han descrito algunos casos (Németh, 1986) todavía no se ha confirmado este hecho.

La detección del virus de la sharka se lleva a cabo por diversos procedimientos. La detección por observación directa de síntomas es una práctica que, para ser fiable, debe realizarse durante períodos de observación largos, teniendo en cuenta además los numerosos factores que pueden influir en la manifestación de los síntomas. Por lo tanto la detección de PPV se realiza por

técnicas más fiables y variadas: métodos biológicos basados fundamentalmente en la inoculación de plantas indicadoras (Bernhard et al., 1969; Sutic et al., 1971; Marteli en Milne, 1988) métodos serológicos (Kerlan y Dunez, 1979; Cambra et al., 1991, López Moya et al., 1994; Cambra et al., 1994), inmunomicroscopía (Kerlan et al., 1981), hibridación molecular (Varveri, 1987; Wetzel et al., 1990; Palkoviks et al., 1994; Levy et al., 1995) y detección por PCR (Levi y Hadidi, 1991; Bousalemm et al., 1994; Candresse et al., 1994 y 1995; Olmos et al., 1997 y 1999). La detección de virus durante los períodos en que la planta no muestra síntomas ha sido objeto de estudio de algunos grupos (Adams, 1978; Dosba et al., 1986; Korschineck et al., 1991; Pasquini et al., 1995; Adams et al., 1999) que han analizado la eficacia de detección de diferentes metodologías en muestras de hoja, tallo, corteza y raíz. Pero hoy en día, a pesar de todo, el desarrollo de un método seguro, fácil de aplicar a un número elevado de muestras, rápido y económico es todavía una meta a conseguir.

Las características de la enfermedad de la sharka hacen que su control sea complejo. Es importante establecer medidas preventivas que eviten la propagación del virus, siendo esencial la certificación por metodologías fiables que aseguren que las especies empleadas en plantaciones nuevas están libres de virus, así como el control del material vegetal intercambiado entre diferentes países. Resulta igualmente esencial el arranque de plantas infectadas, sobre todo cuando la enfermedad empieza a manifestarse en un cultivo, así como la lucha contra los vectores, si bien el eficiente sistema de transmisión de los virus junto con los sistemas de control ineficaces hace se favorezca su dispersión (Marco, 1993; Webb y Linda, 1993). La lucha contra la enfermedad de la sharka también ha llevado a la búsqueda de variedades de cultivos que sean capaces de "tolerar" el virus sin que éste afecte notablemente a la producción e incluso la obtención de variedades resistentes por mejoramiento tradicional (Massonié y Maison, 1986; Dosba et al., 1988; Karayiannis y Mainou, 1993; Audergon et al., 1994; Polák et al., 1995; Balan et al., 1995; Erdős et al., 1995) o por plantas transgénicas (Sanford y Johnson, 1985; Lomonosoff, 1995) que expresen secuencias nucleotídicas del genoma de PPV (Guo et al., 1997, 1998 y 1999; Jacques et al., 1998; Tavet-Roudet et al., 1998; Wittner et al., 1998).

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

En la actualidad los potyvirus constituyen uno de los grupos de virus de plantas más importantes ya que afectan a un número elevado de cultivos de interés agrícola. Las pérdidas originadas por estos virus en casi todo el mundo son millonarias, y el problema se ve a menudo agravado por la capacidad de los potyvirus para transmitirse de unas plantas a otras por insectos vectores. El control de las poblaciones naturales de vectores así como la detección rápida y segura de los potyvirus en los cultivos resulta esencial para evitar la propagación de las enfermedades. Por ello son numerosos los grupos que hoy en día trabajan en distintos aspectos relacionados con el conocimiento de la biología de los potyvirus.

Hasta la fecha se han conseguido importantes avances en la determinación del funcionamiento de las distintas proteínas virales que intervienen en el proceso de transmisión de potyvirus por vectores. Los numerosos estudios han llegado incluso a concretar regiones dentro de las proteínas de potyvirus implicadas directamente en dicho proceso. En este sentido son fundamentales los trabajos moleculares en los que a partir de clones disponibles de genoma completo de diferentes potyvirus se realizan análisis mutacionales de diferentes regiones. Todos estos conocimientos relacionados con los mecanismos de transmisión de los potyvirus resultan imprescindibles para llegar en un futuro al conocimiento pleno del proceso y, por consiguiente, al establecimiento de sistemas eficaces de control.

Dentro del grupo de los potyvirus, resulta de destacada importancia el denominado virus de la viruela del ciruelo (Plum Pox Virus, PPV), que origina la llamada enfermedad de la Sharka. Esta enfermedad afecta a frutales de hueso como el melocotonero, albaricoquero, ciruelo, y en España es el responsable de la pérdida de varias cosechas al año, por lo que el estudio de este potyvirus en concreto resulta de un enorme interés.

En nuestro grupo se han venido estudiando distintos aspectos relacionados con el virus de la Sharka, que han originado ya resultados de aplicación inmediata como son la obtención de una gama de anticuerpos con utilidad para detección del virus en campo.

En este trabajo se aborda el conocimiento de aspectos moleculares de la transmisión por pulgones de PPV, empleando para ello dos aislados obtenidos de muestras de campo, uno de los cuales no es transmitido por pulgones. Se ha llevado a cabo el estudio de las proteínas virales implicadas en la transmisión de ambos aislados, comparando los datos obtenidos para cada caso e intentando explicar el diferente comportamiento de los dos aislados en transmisión. El conocimiento de la causa de no transmisibilidad del aislados de PPV resultaría de

gran importancia y ayudaría al establecimiento de los distintos residuos aminoacídicos involucrados en la actividad de las distintas proteínas virales cuya intervención en el proceso de transmisión se conoce hasta ahora.

Por otra parte, las proteínas de diferentes potyvirus pueden en ocasiones mediar la transmisión de virus heterólogos, de modo que un potyvirus que resultase no transmisible por pulgones podría ser transmitido siempre y cuando en la planta ocurriera la infección de otro potyvirus relacionado. Aunque no todas las combinaciones de potyvirus resultarían eficaces, nos interesa iniciar una línea de investigación en la que se analicen las combinaciones heterólogas funcionales entre distintos potyvirus. En este sentido en nuestro laboratorio disponemos de otro potyvirus, el virus Y de la patata (Potato Virus Y, PVY) con el que se han conseguido algunos resultados referentes a combinaciones heterólogas de potyvirus.

*MATERIALES
Y MÉTODOS*

1. AISLADOS VIRALES

Los aislados de PPV denominados PPV 3.3 y PPV 5.15 proceden de cultivos de ciruelo japonés y albaricoquero, respectivamente, y fueron cedidos por el Dr. M. Cambra (Moncada, Valencia). El aislado PPV 3.3 se aisló de cultivos de ciruelo japonés var. Red Beaut y el 5.15 se obtuvo de albaricoquero var. Canino, mantenidos ambos por injerto en especies frutales (melocotonero GF-305 o Nemaguard). En nuestro laboratorio se inocularon mecánicamente en plantas de *Nicotiana benthamiana* y se guardó como material desecado parte de material infectado. A partir de este inóculo origen, los aislados virales se han mantenido por inoculaciones mecánicas. El aislado PPV 3.3, no transmisible por pulgones, presenta una delección de quince aminoácidos en el extremo amino terminal de la CP, generada posiblemente en su paso de huésped leñoso a herbáceo. Este aislado no se transmite por pulgones.

Los “aislados” de PPV denominados R3 y R3-NAT fueron cedidos por el Dr. J.A. García (CNB-CSIC Madrid). PPV R3 se obtiene por transcripción de un clon de genoma completo del aislado holandés PPV Rankovik (Laín *et al.*, 1989) (ver apdo. 2). PPV R3-NAT proviene de PPV R3 al cual se le ha reproducido la misma delección descrita para PPV 3.3 y, al igual que éste, no se transmite por pulgones.

El aislado de PVY P-21-82 fue proporcionado por el Dr. F. Ponz (CIT-INIA, Madrid). Desde su recolección se mantuvo mediante inoculación por pulgones en plantas de tabaco, y se denominó PVY 0 AT para diferenciarlo de otra variante no transmisible del mismo aislado obtenida en el laboratorio por inoculaciones mecánicas en tabaco, denominado PVY 0 NAT (Canto *et al.*, 1995).

2. PLÁSMIDOS

El plásmido Bluescript II KS(+) (Stratagene) se empleó para clonar los genes HC y CP de PPV (ver apdo. 14 de esta sección).

El plásmido pMal-p2 (New England Biolabs) es un vector de clonaje empleado como sistema de expresión de proteínas en bacterias en el que se clonó la secuencia correspondiente al HC del aislado PPV 5.15 (ver apdo. 23).

Los plásmidos pR3, pNAT, pIC y pGG5S6 (figura 4) fueron cedidos por el Dr. J.A. García.

pR3 contiene una copia del genoma completo de PPV Rankovik, clonado bajo el promotor transcripcional de la T7 ARN polimerasa. pNAT se diferencia de pR3 únicamente por presentar una delección de 45 nucleótidos en la región 5' del gen de la CP.

El plásmido pIC contiene una copia de ADN del genoma completo de PPV Rankovik precedido del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) que permite la inoculación directa en plantas a partir de ADN plasmídico. Este plásmido contiene el intrón ST-LS1 de un gen de patata (*Solanum tuberosum*) (Vancanneyt *et al.*, 1990) que interrumpe el marco de lectura del gen P3, lo cual aumenta la infectividad del clon.

El plásmido pGG5S6 contiene las secuencias de P1, HC, P3 y 6k₁ de PPV Rankovik.

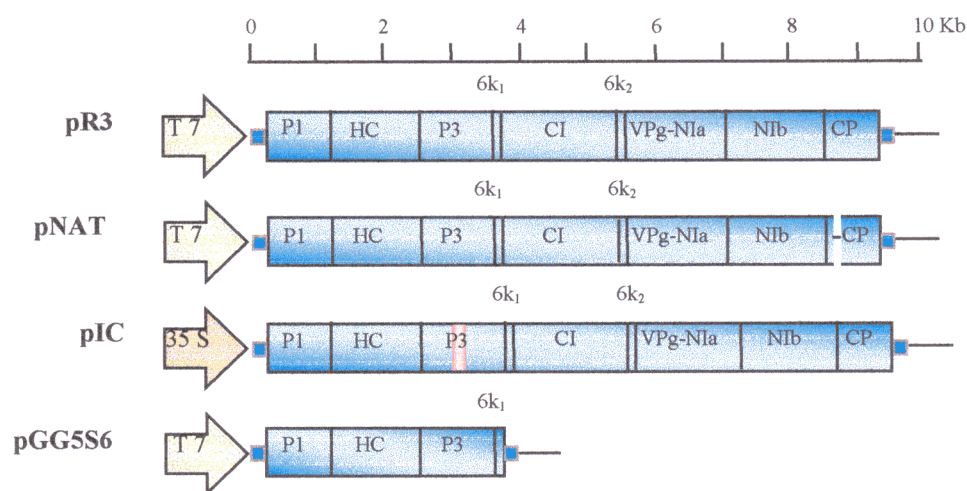


Figura 4. Clones con genoma de PPV Rankovik. El promotor correspondiente aparece señalado a la izquierda. En pNAT se indica la zona delecionada en el gen de la CP. El clon pIC contiene en la secuencia de P3 el intrón ST-LS1 (señalado en rojo).

3. PLANTAS ENSAYO

Las plantas empleadas para el mantenimiento y propagación de los aislados de PPV fueron *Nicotiana benthamiana* Domin. y *Nicotiana clevelandii* Gray. En el caso de aislados de PVY se emplearon plantas de tabaco *N. tabacum* L. var. Xanthi nc. Las plantas se mantuvieron en cámaras de cultivo a 22-24 °C con 60% de humedad relativa y fotoperíodo de 16 h. Las semillas de *N. clevelandii* germinaron

tras ser sumergidas durante 4 ó 5 horas en una solución de ácido giberélico a 0,1 mg/ml.

4. INOCULACIÓN DE VIRUS EN LAS PLANTAS

Los aislados virales se inocularon mecánicamente en sus huéspedes herbáceos a partir de hojas de plantas inoculadas desde entre 15 a 20 días y con síntomas claros de infección o bien a partir de material desecado o congelado y conservado a -80° . El material infectado se trituró en tampón fosfato sódico 0.02 M pH 7.0. El extracto se frotó sobre hojas de plantas sanas espolvoreadas previamente con celite que actúa como abrasivo. Las hojas inoculadas se lavaron inmediatamente con agua y se cubrieron durante unos minutos con papel húmedo para evitar la aparición rápida de heridas sobre su superficie. Posteriormente se mantuvieron en la cámara de cultivo.

5. TRANSMISIÓN POR PULGONES

Los pulgones empleados para estos experimentos proceden de un clon de la especie *Myzus persicae* Sulz. que se mantuvieron en cámara de cría sobre plantas de tabaco a temperatura de 20-22 °C, con humedad relativa del 70% y fotoperíodo de 16 horas. Se recogieron pulgones ápteros en viales de vidrio y se sometieron a un período de ayuno de 3 a 4 horas previamente al ensayo.

En transmisiones de planta a planta los pulgones se colocaron sobre hojas infectadas cortadas y dispuestas en una placa Petri, permitiéndoles un tiempo de adquisición de 5 a 10 minutos. A continuación, se transfirieron con un pincel a plantas sanas de unos 2 cm de altura (10 a 15 pulgones por planta), las plantas se cubrieron con un recipiente de vidrio para evitar la movilidad de los pulgones. Como período de inoculación se dejó a los pulgones una noche alimentándose en estas plantas, tras lo cual se eliminaron por pulverización con insecticida.

En ensayos de transmisión mediante adquisición por membranas los pulgones se transfirieron, tras el período de ayuno, a cilindros opacos cuya abertura superior se cubrió con membranas estiradas de Parafilm. Sobre la membrana se dispuso una gota de tampón TSM con 20% de sacarosa que contenía virus y/o HC purificados. Los pulgones ascendían por el cilindro e introducían sus estiletes en la membrana, adquiriendo la solución. Tras 5-10 minutos de adquisición se transfirieron a plantas sanas y se continuó el proceso como en el caso anterior.

En ocasiones realizaron transmisiones secuenciales en las que la adquisición del HC se hizo previamente a la adquisición del virus. En un primer paso el pulgón adquirió el HC (bien alimentándose sobre planta o a través de membrana) y a continuación tuvo acceso a las partículas virales (nuevamente sobre hoja o en sistemas de membrana). Tras esta secuencia de alimentación los pulgones se transfirieron a plantas sanas.

6. PURIFICACIÓN DE VIRUS

La purificación de PPV se hizo siguiendo el protocolo descrito por Laín *et al.* (1988) con las modificaciones incorporadas por López Moya *et al.*, (1994). Se recogieron hojas de *N. benthamiana* infectadas a los 20 ó 30 días de la inoculación y se homogeneizaron en 2 volúmenes (p/v) de tampón McIlvain citrato-fosfato (13 mM ácido cítrico y 180 mM fosfato sódico, pH 7,0) que contenía 0,2 % de ácido tioglicólico, 10 mM de dietilditiocarbamato (DIECA), 500 mM de urea y 1/3 vol. de cloroformo. Para evitar la degradación de la CP viral se añadió al tampón una mezcla de inhibidores de proteasas (Ehlers y Paul, 1986): 1 mM de fenilmetilsulfonilo fluoruro (PMSF), 2mM de ácido etilendiaminotetracético (EDTA) y 20 mM de ácido iodoacético.

El homogeneizado se clarificó a 6.000 x g 10 minutos y posteriormente se centrifugó 90 minutos a 60.000 x g. El sedimento con los virus se resuspendió en 1/2 volumen de tampón 10 mM citrato-fosfato pH 7,0 con 0,2% de β -Mercaptoetanol y 1 M urea, repitiendo los dos pasos de centrifugación. El sedimento se resuspendió en 1/10 volumen con tampón 100 mM borato sódico pH 8,2 con 10 mM EDTA. Este resuspendido se clarificó y se hizo pasar por 8 ml de un colchón de sacarosa al 20% durante 2 horas a 60.000 x g. El sedimento se resuspendió en 0,02 volúmenes del mismo tampón y se centrifugó en un gradiente de sacarosa del 10-40% durante 90 minutos a 75.000 x g. La fracción que contenía el virus (situada entre el 10 y 20% de sacarosa) se recuperó y diluyó 1:1 nuevamente en tampón 100 mM borato sódico, centrifugándola 3 h a 60.000 x g. El sedimento se resuspendió en tampón 50 mM borato sódico pH 8.2.

Todo este proceso se realizó en frío y los virus purificados se guardaron congelados a -20 ó -80°C. En ocasiones, para agilizar el proceso, prescindimos bien del colchón de sacarosa o bien del gradiente de sacarosa e incluso de ambos pasos, sustituyéndolos por dos ciclos adicionales de clarificación a 6.000 x g y centrifugación a 60.000 x g como los descritos anteriormente.

La concentración de virus en el purificado final se calculó por lectura en espectrofotómetro y por análisis electroforético de las purificaciones virales comparando la banda correspondiente a la CP viral con un patrón de BSA de peso molecular conocido.

7. PURIFICACIÓN PARCIAL DEL HC.

7.1. Purificación de HC de PVY

La proteína HC se purificó siguiendo el protocolo de Pirone y Thornbury (1983). Se recogieron hojas de tabaco infectadas tras 15 ó 20 días de la inoculación, se eliminaron los nervios centrales y se trocearon. Las hojas se infiltraron en vacío en tampón de extracción (100 mM acetato amónico pH 8,8, 20 mM EDTA- Na_2 , 20 mM DIECA- Na_2), se filtraron por gasa y se trituraron en un volumen (p/v) de tampón equivalente. El extracto, clarificado 5 minutos a 8.000 x g y filtrado por "Miracloth", se centrifugó 1 hora a 40.000 rpm en rotor 45-Ti (Beckman). Al sobrenadante, nuevamente filtrado, se le añadió polietilenglicol (PEG) 6.000 al 8%, agitándolo 1 hora en frío. Posteriormente, se centrifugó 5 minutos a 6.000 g y el precipitado y se resuspendió en tampón TSM (100 mM Tris- H_2SO_4 pH 7,2, 20 mM SO_4Mg) en un volumen 1/10 del sobrenadante obtenido en la ultracentrifugación. Esta fracción se volvió a clarificar y concentrar con PEG 6.000. El nuevo precipitado se resuspendió en 1-2 ml de tampón TSM y se clarificó por última vez.

Con el fin de comprobar que las preparaciones obtenidas estaban libres de virus, éstas se inocularon mecánicamente en plantas de *N. tabacum* var. Xanthi nc. La presencia de proteína HC se verificó por ensayos Western blot empleando anticuerpos monoclonales frente a la proteína (Canto *et al.*, 1995a).

7.2. Purificación de HC de PPV

El protocolo empleado para purificar el HC de este potyvirus fue también el descrito por Pirone y Thornbury (1983). Esta proteína no había podido ser purificada por lo cual realizamos un seguimiento del proceso de purificación, analizando las diferentes etapas del procedimiento mediante Western blot con anticuerpos policlonales para el HC de PPV (ver apdo. 9.3). Para ello, se tomaron alícuotas de 50 μl que se diluyeron con tampón de carga 4X (400 mM Tris-HCl pH 6,8, 10% SDS, 20% β -mercaptoetanol, 20% sacarosa, 0,05% azul de bromofenol) (Laemmli, 1970), hirviéndolas posteriormente 5 minutos. Se emplearon 20 μl de cada alícuota para análisis por Western blot (ver apdos. 8 y 9).

La posible presencia de partículas virales y/o CP en el purificado final de HC de PPV se analizó por ensayos Western blot con anticuerpos monoclonales para la CP de PPV (López-Moya *et al.*, 1994). Una segunda comprobación de la existencia de partículas virales así como de su capacidad infectiva se llevó a cabo inoculando 5µl del purificado del HC en plantas de *N. benthamiana*.

8. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO

Preparaciones de virus y HC purificados así como extractos de plantas se analizaron en geles desnaturalizantes de acrilamida-bisacrilamida (29.2:0.8) (SDS-PAGE) al 12% (Sambrook *et al.*, 1989) empleando el soporte Mini-Protean II (Bio-Rad). Las muestras de proteínas purificadas se diluyeron 1:3 en tampón de carga 4X (Laemmli, 1970) y se hirvieron 5 minutos. Las muestras de hoja se trituraron en tampón de carga 2X a una dilución 1/10 (p/v). Las proteínas se visualizaron tiñendo el gel en una solución de azul de Coomassie R-250 al 0,25% con 20% de metanol y 10% de ácido tricloroacético, eliminando el exceso de colorante con una solución desteñidora (agua/metanol/ácido acético, 7:3:1). Los pesos moleculares de las proteínas se estimaron comparando su movilidad electroforética con la de los marcadores de peso molecular conocido SeeBlue™ (Novex).

9. ANÁLISIS SEROLÓGICO.

La detección serológica de proteínas virales se llevó a cabo mediante ensayos Western blot, mientras que la detección de PPV en plantas se realizó por el procedimiento de ELISA-DASI o de doble sandwich indirecto de anticuerpos.

9.1. Inmunoelectrotransferencia (Western blot)

Las proteínas se separaron por SDS-PAGE y posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa mediante el sistema Mini Trans-Blot Cell (Bio Rad) empleando tampón Tris-Glicina-SDS con 20% de metanol y una corriente de 250 mA durante 1 hora (Towbin *et al.*, 1979). La membrana se incubó 1-2 horas con leche desnatada en polvo al 5% en tampón PBS (0,015 M Na₂PO₄, 0,15 M ClNa pH 7,4). Posteriormente se incubó primero toda una noche con el anticuerpo correspondiente diluido en PBS 5% leche desnatada en polvo y a continuación durante 2 horas con un segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa. Como sustrato para la enzima se empleó 0,3 mg/ml 4-cloro-naftol, 0,01% H₂O₂ en PBS.

9.2. ELISA-DASI

Los ensayos ELISA-DASI se llevaron a cabo empleando el kit de la casa comercial REAL.

Las placas se tapizaron con una dilución 1/100 de inmunoglobulinas (IgGs) policlonales de conejo anti-PPV en tampón carbonato pH 9,6, incubándolas 4 horas a 37 °C ó 16 horas a 4 °C. Las placas se lavaron con PBS con un 0,05 % de Tween-20 (PBST) antes de añadir las muestras a analizar.

Los extractos de planta se prepararon en un volumen 1/10 de tampón PBS conteniendo 2 % de polivinil pirrolidona (PVP-10) y 0,2 % de dietilditiocarbamato sódico (DIECA). Posteriormente se clarificaron en una microfuga a 5.000 rpm durante 5 minutos, añadiendo el sobrenadante a los pocillos. La placa se mantuvo 16 horas a 4 °C. Tras un nuevo lavado, se hizo una incubación de 2 horas a 37 °C con anticuerpos monoclonales a dilución 1/1000 en PBS con 0.5 % de leche desnatada en polvo, seguida de otra incubación en iguales condiciones con IgGs anti-ratón conjugadas con fosfatasa alcalina.

En el revelado se empleó p-nitrofenil-fosfato como sustrato a una concentración de 1 mg/ml en tampón sustrato (pH 9.8). La absorbancia se registró a 405 nm (DO₄₀₅) en el lector de placas EAR 400 SLT-Labinstruments.

9.3 Obtención de anticuerpos policlonales frente al HC de PPV

9.3.1 Clonaje de HC de PPV en el plásmido de expresión pMal-p2

pMalTM-p2 (New England Biolabs) es un vector empleado como sistema de expresión y purificación de proteínas en *E. coli* que contiene el gen malE de *E. coli* fusionado al gen *lacZα*. La expresión de la proteína de fusión (MBP-β Galactosidasa) codificada por ambos genes está regulada por un promotor lac inducible por isopropil β-D-tiogalactopiranosido (IPTG). Este sistema permite clonar y expresar una secuencia de interés fusionada al extremo 3' del gen malE, y facilita la purificación de la proteína de fusión, siendo posible separarla posteriormente por digestión con la proteasa factor Xa.

El gen HC de PPV 5.15 se amplificó por PCR con los cebadores HC Mal 1 y HC Mal 2 (tabla 3) empleando como molde el clon p1HC 5.15

Tabla3. Cebadores empleados para el clonaje del HC de PPV en el vector de expresión pMal-p2.

NOMBRE ^a	POSIC. ^b	DIANA	SECUENCIA 5'-3' ^c
HC Mal (+)	2444	<i>Hind</i> III	ATCAAGCTTTTACTATCCAACCAGGTATGTTTTTCATATTTG
HC Mal 2(-)	1071	<i>Eco</i> RI	TGAATTCATCGAGGGAAGGTCTGACCCAGGCAAACAATTTTGG

^a El signo (+) junto al nombre indica secuencia igual a la viral, mientras que el signo (-) indica secuencia complementaria a la viral.

^b Numeración según Laín *et al.* (1989).

^c Las secuencias de las dianas de restricción aparecen señaladas en negrilla. El cebador HC Mal 1 incorpora dos tripletes de parada de la traducción (indicados en verde), mientras que HC Mal 2 incluye una secuencia que codifica para la diana del factor de digestión Xa (señalada en rojo).

El fragmento de PCR se digirió con las enzimas *Eco* RI y *Hind* III en condiciones subóptimas que permitieron digestiones parciales, ya que la diana *Hind* III está contenida dos veces en la secuencia amplificada del HC de PPV. Los productos de la digestión se sometieron a electroforesis en gel de agarosa, y la banda correspondiente al fragmento con sólo sus extremos digeridos se eluyó y clonó en el plásmido pMal (ver apdo 14). El clon obtenido se denominó pMal-HC PPV y se purificó según lo descrito en el apartado 14, secuenciándolo con los cebadores male y M13/PUC contenidos en el vector.

9.3.2. Expresión de la proteína de fusión MBP-HC PPV

Las cepas DH5α y BL21(DE3) de *E. coli* se transformaron con los plásmidos pMal y pMal-HC PPV. La expresión de las proteínas se realizó siguiendo el protocolo descrito por el fabricante, con leves modificaciones.

Las bacterias recombinantes se crecieron a 25 °C en medio LB partiendo de un precultivo mantenido 25 horas a igual temperatura. Cuando la D.O.₆₀₀ llegó a 0,5 se añadió el inductor IPTG hasta una concentración final de 0,3 mM, incubando el cultivo durante 3 horas. Los pasos posteriores se hicieron a 4°C. El cultivo se centrifugó 20 minutos a 4.000 x g, el sedimento se resuspendió en 50 ml de tampón de lisis (10 mM HPO₄Na₂ pH 8, 30 mM ClNa, 0,25% Tween 20, 10 mM β-mercaptoetanol, 10 mM EDTA, 10 mM EGTA), se congeló en nitrógeno líquido y tras permanecer 16 horas a -80°C se descongeló. Se añadió lisozima a una concentración final de 1 mg/ml, dejándola actuar 30 minutos con agitación. La mezcla se sonicó sometiéndola a 5 ciclos de 30 segundos cada uno, se congeló y, tras la descongelación, se centrifugó 30 minutos a 9.000 x g. Se recogieron 50 ml de

sobrenadante (fracción soluble) y el sedimento se resuspendió en igual volumen de tampón de lisis (fracción insoluble).

Alícuotas de los cultivos en etapas pre y post-inducción con IPTG así como de las fracciones finales se analizaron por SDS-PAGE.

9.3.3. Purificación de la proteína de fusión MBP-HC

Para la purificación del HC inicialmente se siguió el protocolo de New England Biolabs, pero al resultar infructuoso (Resultados, apdo. 9) se procedió a la purificación de la proteína de fusión (MBP-HC) mediante elución a partir de geles de poliacrilamida. Las fracciones finales obtenidas en la expresión de proteínas se sometieron a SDS-PAGE, tiñendo el gel con una solución de Azul de Coomasie al 0,25% en agua destilada. La banda del gel de tamaño correspondiente a la MBP-HC se cortó, se destiñó por lavados con agua y se sometió a electroelución con el sistema "Electro-Eluter Model 422" (Bio Rad).

El volumen total de proteína eluida se concentró con el sistema Centricon 30 (Millipore) en un volumen de 1l de tampón 0,2 M bicarbonato sódico, 0,02% SDS en agitación durante 24 h incluyendo un cambio de tampón. El dializado se analizó por SDS-PAGE y la cantidad de proteína se calculó por comparación con un patrón de BSA de concentración conocida. La muestra se secó en vacío (Speedvac, Savant) y se resuspendió en tampón PBS estéril.

9.3.4. Inmunización del conejo con proteína HC

El esquema de inmunización del conejo consistió en un total de seis inyecciones subcutáneas en cuello a intervalos de 20 a 22 días en las que se aplicó un volumen de 500 µl de muestra (80-100 µg de antígeno) diluido en un mismo volumen de coadyuvante completo de Freund (Sigma). Transcurridos 7 y 10 días de las inyecciones cuarta y quinta se tomaron muestras de sangre para comprobar la aparición de anticuerpos frente al HC de PPV. Estas muestras se incubaron 30 minutos a 37 °C y posteriormente 16 horas a 4 °C . El suero así liberado se clarificó 10 minutos a 4.000 x g para emplearlo posteriormente en ensayos Western blot a diluciones 1/1000 y 1/3000. Como segundo anticuerpo utilizamos anticuerpos de cabra anti-conejo conjugados con peroxidasas. El suero total se obtuvo 7 días después de la sexta inyección y fue igualmente empleado en ensayos Western blot. Con el fin de eliminar los anticuerpos contaminantes de este suero final se limpió el mismo por adsorción.

9.3.5. Inmunoadsorción del suero anti-HC de PPV

9.3.5.1. Preparación de polvo acetónico

Para la obtención de polvo acetónico de plantas se homogeneizaron hojas de *N. benthamiana* sana en mortero con nitrógeno líquido. Se obtuvo un polvo fino que se trató con acetona a temperatura ambiente 30 minutos en agitación, recuperándolo posteriormente por filtrado y repitiendo el proceso hasta conseguir un polvo libre de pigmentos. El polvo se secó y conservó a 4°C en tubo hermético.

El polvo acetónico de bacterias se preparó a partir de la fracción soluble de bacterias que expresaban MBP (ver apdo. 22). Esta fracción se diluyó con cuatro volúmenes de acetona fría, agitando la mezcla 30 minutos a 4 °C y centrifugándola posteriormente 10 minutos a 10.000g. El precipitado seco se trituroó hasta conseguir un polvo fino que se guardó a 4°C en un tubo hermético.

9.3.5.2. Inmunoadsorción

El antisuero total se diluyó 1/5 con PBS estéril y se le añadió polvo acetónico de bacteria hasta una concentración del 1% (p/v). La mezcla se mantuvo 40 minutos a temperatura ambiente y 20 horas a 4 °C con agitación, centrifugándose a continuación 10 minutos a 3.000 x g. A partir del sobrenadante se repitió el proceso empleando en este caso polvo acetónico de planta.

Este suero se pasó por un prefiltro con poro de 10 µm de diámetro y seguidamente por un filtro Minisart de 0,2 µm (Sartorius). Finalmente se alicuotó y guardó a -20 °C.

La especificidad del suero así como las diluciones apropiadas para su uso fueron analizadas en ensayos Western blot.

10. ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN HC-CP EN MEMBRANA DE NITROCELULOSA

La purificación de HC de PPV así como la producción de anticuerpos policlonales frente a esta proteína nos ha permitido analizar la interacción entre el HC y monómeros de CP siguiendo el método descrito por Blanc *et al.* (1997).

Alícuotas de purificaciones de virus PPV 3.3 y PPV 5.15 que contenían entre 3 y 4 µg de viriones se sometieron a SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12%,

tras lo cual se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Estas membranas se incubaron 24 h a 4°C en tampón TSM (100 mM Tris ClH pH 7,2, 20 mM MgCl₂) con 5% de leche desnatada en polvo, permitiendo así la renaturalización parcial de la CP y la saturación de los puntos de unión de la membrana no ocupados por proteína. Las membranas se incubaron posteriormente durante una noche con el HC purificado de PPV 3.3 o PPV 5.15 a una dilución 1/50 en tampón TSM. Tras someterlas a tres lavados de 15 minutos en TSM y uno en TSM con 0,02% de Tween 20 (TTSM) las membranas se incubaron 4 h a 4°C con anticuerpos policlonales frente al HC a una dilución 1/300 en tampón TTSM con 5% de leche desnatada en polvo. Por último las membranas se lavaron 2 veces con TSM y otras 3 con PBS para incubarlas 2h con anticuerpo anti-conejo conjugado con peroxidasa y diluido 1/2000 en tampón PBS. Como sustrato para la enzima se empleó 4-cloro-naftol.

11. AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

La obtención de fragmentos amplificados de ADN a partir del ARN viral nos ha permitido conocer la secuencia correspondiente a diferentes porciones del genoma de PPV además de ser empleada como una técnica de diagnóstico y, por supuesto, como una herramienta en la manipulación del genoma viral.

11.1 Extracción de ARN viral

La extracción de ARN viral se llevó a cabo a partir de material vegetal infectado siguiendo el procedimiento de Logemann *et al.* (1987) o bien a partir de partículas virales purificadas con el procedimiento descrito por Ullman *et al.* (1993).

Para la extracción de ARN total de plantas de *N. benthamiana* infectadas se homogeneizaron entre 30 y 50 mg de hoja en nitrógeno líquido con tampón guanidina (8M hidrocloreuro de guanidina pH 7, 20 mM MES, 20 mM EDTA, 50 mM β-Mercaptoetanol). El ARN se extrajo con fenol/cloroformo/ isoamil alcohol (25:24:1) centrifugando 5 minutos a 4°C y 13.000 rpm en microfuga. A la fase acuosa se le añadieron 0,2 volúmenes de acetato sódico 1M pH 4,8 y 0,7 volúmenes de etanol 100%, manteniéndolo 30 minutos a -20°C y centrifugando posteriormente. El precipitado se lavó con etanol 70% y se resuspendió en 25 µl de agua estéril.

En la extracción a partir de partículas virales se diluyeron 2 a 10 µl de virus purificado en un mismo volumen de tampón de extracción 2X (100 mM Tris-ClH

pH 8, 2mM EDTA, 2% SDS) y se incubaron 10 minutos a 65°C en presencia de 0,5 mg/ml de proteasa K (Boehringer. El ARN viral se aisló de la solución mediante extracción con fenol/cloroformo/isoamil alcohol y precipitación con etanol. La resuspensión final se hizo en 10 ó 20 µl de agua estéril.

11.2. Inmunocaptura de virus (IC)

Este protocolo se basa en el método descrito para el virus de la hepatitis A (Jansen *et al.*, 1990) que fue adaptado para PPV por Wetzel *et al.* (1992).

Tubos de 0,2 ml se tapizaron con anticuerpos policlonales para PPV o PVY diluidos 1/100 en tampón carbonato pH 9,6, dejándolos una noche a 4 °C ó 3 horas a 37°C. A continuación los tubos se lavaron con PBST y se incubaron durante 1 hora a 37 °C con una solución de albúmina de suero bovino (BSA) al 1% en PBS para bloquear posibles lugares de unión no tapizados. Tras un nuevo lavado se añadieron 20 µl de extracto de planta (preparado igual que para ELISA-DASI) y se dejó toda una noche a 4°C. Los viriones quedaron retenidos en los tubos, que se lavaron de nuevo y se emplearon directamente para llevar a cabo reacciones de RT-PCR.

11.3. Transcripción inversa (RT)

El ARN viral se empleó como molde para obtener una cadena complementaria de ADN mediante una reacción de transcripción inversa (RT) catalizada por la enzima transcriptasa reversa AMV (Avian myeloblastosis virus-reverse transcriptase) de Promega. Para ello partimos de ARN purificado (de 2 a 5 µl) así como de partículas virales obtenidas por inmunocaptura (IC-RT). La reacción se llevó a cabo en un volumen de 20 µl de tampón (50 mM Tris-ClH pH 8,9, 50 mM ClK, 7,5 mM Cl₂Mg) que contenía los cuatro desoxinucleótidos (dNTPs) a 0,125 µM cada uno, el cebador correspondiente a la secuencia complementaria del extremo 3' del fragmento del genoma viral a amplificar y 1 unidad de AMV-RT. La transcripción inversa transcurrió durante 45 minutos a 42°C, aumentando posteriormente la temperatura a 65 °C 5 minutos, para inactivar la enzima.

11.4. Amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El ADN obtenido en la transcripción inversa se amplificó por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para ello de 5 a 20 µl de la RT se ajustaron a un volumen final de 100 µl en tampón 100 mM Tris-ClH pH 8,3, 500 mM ClK y 15

mM Cl_2Mg , incluyendo los cebadores necesarios a 0,5 μM , los cuatro dNTPs a 0,25 mM y 2 unidades de ADN-polimerasa. Las enzimas empleadas fueron Taq-ADN polimerasa (Perkin Elmer y, ocasionalmente, de Promega) y, excepcionalmente, la enzima High Fidelity (Boehringer).

Los programas de amplificación fueron diferentes dependiendo de las características del fragmento a amplificar. En cualquier caso, éstos incluyeron la desnaturalización inicial del ADN a 95 °C durante 5 minutos, seguida por un número de ciclos variable (25 a 35) con una desnaturalización inicial de 15 segundos a 94 °C, una etapa de hibridación de 30 segundos a temperatura adecuada para cada caso (entre 50 y 57 °C), seguida de una fase de elongación de la cadena de ADN a 72 °C de 1 minuto a 1 minuto y 30 segundos, dependiendo de la longitud del fragmento. Los fragmentos amplificados se comprobaron analizando 5 ó 10 μl de la reacción en un gel de agarosa al 1% en tampón 0,045 M Tris-Borato pH 8, 1 mM EDTA (TBE 0,5X) que contenía bromuro de etidio (Sambrook *et al.*, 1989). Las bandas se observaron con iluminación ultravioleta y como marcador de peso molecular se emplearon los fragmentos digeridos del fago λ con las enzimas de restricción *Eco* RI y *Hind* III.

12. CLONAJE DE LOS GENES HC Y CP DE PPV EN EL PLÁSMIDO PBLUESCRIPT

Las técnicas moleculares empleadas para la amplificación y clonaje de las regiones codificadoras de las proteínas HC y CP de los aislados PPV 3.3 y 5.15 han sido las descritas en Sambrook *et al.* (1989)

12.1 Cebadores y amplificación por RT/PCR

El diseño de los cebadores se llevó a cabo de acuerdo a las secuencias de los aislados PPV-Rankovik (Laín *et al.*, 1989), PPV-D (Teycheney *et al.*, 1989) y PPV-NAT (Maiss *et al.*, 1989). En el extremo 5' de cada cebador se incorporaron secuencias diana correspondientes a las diferentes enzimas de restricción empleadas en el proceso de clonaje. Las secuencias, posiciones y dianas de restricción de los cebadores se indican en la tabla 1.

Tabla 1. Secuencia de los cebadores empleados para el clonaje y secuenciación de las regiones codificadoras de HC y CP de PPV.

NOMBRE ^a	POSICIÓN	DIANA	SECUENCIA 5'-3'
HC 1 (-) ^b	2478	<i>Eco</i> IR	TTTTGAATTCGTCACACTTATC
HC 2 (+) ^b	986	<i>Xho</i> I	TATAGCTCGAGGAAAACACAATC
HC 5 (-)	1969	<i>Sal</i> I	GTCGACTTCGTGTGTGACGCAGC
HC 6 (+)	1374	<i>Bam</i> HI	GGATCCTATCGTGAACATAATGC
HC 7 (-)	1528	<i>Xba</i> I	TCTAGATGTAGTCTTGTGCGCTC
HC 8 (+)	1848	<i>Pst</i> I	CTGCAGCAGCACTACGTAAGCA
CP 3 (-) ^c	9592	<i>Cla</i> I	GTTTATCGATGATACCGAGACCA
CP 4 (+) ^c	8511	<i>Hind</i> III	CGATATCTTGAAGCTTTTAC
CP 9 (-)	9199	<i>Sal</i> I	GTCGACATTGGATACTCCACTTG
CP 10 (+)	8722	<i>Pst</i> I	CTGCAGTCACGCCAGCAACAAC
CP 11 (-)	8830	<i>Bam</i> HI	GGATCCGAGTTGCTAGGTGATGC
CP 12 (+)	9077	<i>Xho</i> I	CTCGAGGACGATGAAATGAGCATC

^a El signo (+) junto al nombre indica secuencia igual a la viral, mientras que el signo (-) indica secuencia complementaria a la viral

^b Cebadores empleados para el clonaje de la región codificadora del HC

^c Cebadores empleados para el clonaje de la región codificadora de la CP

Las secuencias de las dianas de restricción aparecen señaladas en negrilla. Los nucleótidos subrayados en los cebadores HC 2 y CP 3 representan las mutaciones diseñadas para generar dianas de restricción.

Numeración según Laín *et al.* (1989).

A partir de ARN viral extraído de hojas infectadas (inóculo original desecado o material de inoculaciones posteriores) se realizaron amplificaciones por la técnica de RT-PCR empleando los cebadores HC1 y HC2 en el caso del HC y CP3 y CP4 para la región codificadora de la CP. Las condiciones para la PCR incluyeron una temperatura de hibridación de 56 ó 57 °C y el tiempo de elongación fue de 1 minuto ó 1 minuto 30 segundos en el caso de la CP y del HC, respectivamente, con un total de 30 ciclos. Las condiciones descritas deberían amplificar un fragmento de 1.000 nucleótidos que contenga la secuencia codificadora de la CP y un fragmento de 1.500 nucleótidos correspondiente al gen HC.

12.2. Clonaje en el plásmido pBluescript

Los fragmentos amplificados se digirieron con las enzimas correspondientes, se eluyeron de gel de agarosa empleando el sistema Gene-Clean (Bio 101) y

finalmente en el plásmido pBluescript II KS (Stratagene) digerido con idénticas enzimas. La ligación se llevó a cabo por la enzima T4 ADN ligasa (Promega) durante 16 h a 14 °C. Con los plásmidos recombinantes obtenidos se transformaron bacterias competentes de *Escherichia coli* DH5α. Las colonias fueron analizadas para verificar la presencia del inserto mediante extracción de plásmidos y digestión enzimática. Finalmente, los plásmidos se purificaron a gran escala utilizando el sistema Plasmid Midi Kit (Qiagen).

Se obtuvieron nueve clones diferentes para la región HC del aislado PPV 3.3 y cinco para el aislado 5.15, que se han designado como: p1HC3.3, p2HC3.3, p3HC3.3(A), p3HC3.3(B), p4HC3.3(A), p4HC3.3(B), p5HC3.3, p6HC3.3, pHF-HC3.3, p1HC5.15, p2HC5.15, p3HC5.15, p4HC5.15 y pHF-HC5.15. El número inicial hace referencia a la PCR de la que proceden, de modo que cuando dos clones se han obtenido a partir de una misma PCR se diferencian como (A) y (B). Cuando la polimerasa empleada en la PCR fue la High Fidelity (Boehringer) se indica con las iniciales HF seguidas del nombre del aislado.

12.3. Determinación y comparación de secuencias

Las secuencias nucleotídicas correspondientes a los genes clonados se determinaron mediante el secuenciador ABI PRISM Dye Terminator (Perkin Elmer). Los cebadores que figuran en la tabla 1 se emplearon para la secuenciación. Las secuencias aminoacídicas se dedujeron a partir de las correspondientes nucleotídicas por medio del programa SeqAid (II) versión 3.6 (Rhoads and Roufa, 1989). La comparación de secuencias, tanto de nucleótidos como de aminoácidos, se realizó con el programa Clustal W versión 1.6 (Thompson *et al.*, 1994).

13. CLONAJE DE GENES HC CORRESPONDIENTES A LOS AISLADOS PPV 3.3 Y 5.15 EN CLONES DE GENOMA COMPLETO DE PPV.

Las regiones codificadoras del HC correspondientes a los clones p1HC3.3 y p1HC5.15 se han introducido en los clones pR3 y pNAT. Los distintos pasos del clonaje se ilustran en la figura 5. Los clones obtenidos se han designado como pR3/3.3, pR3/5.15, pNAT/3.3 y pNAT/5.15.

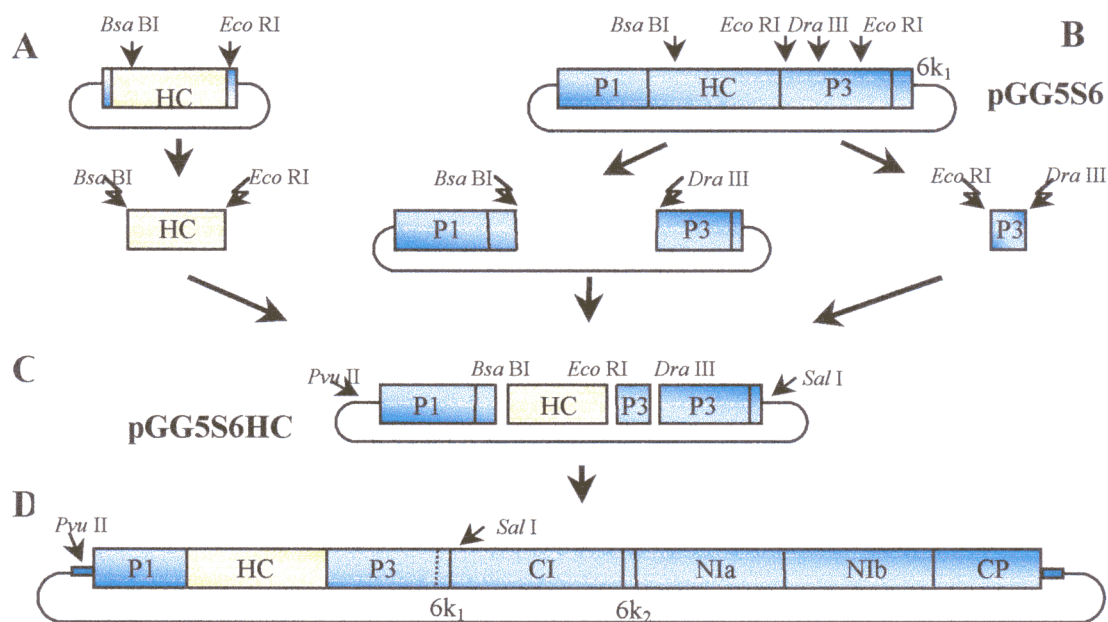


Figura 5. Representación del proceso de clonaje de la secuencia correspondiente al HC de los aislados españoles PPV 3.3 y 5.15 en clones de genoma completo de PPV. A) Plásmidos que contenían la secuencia completa del HC de PPV se digirieron con las enzimas *Bsa* BI y *Eco* RI para obtener un fragmento de 1140 nucleótidos compuesto por 1115 residuos de la región 3' del HC y 25 de la secuencia inicio de la P3. B) La inserción de este fragmento en el genoma de PPV se llevó a cabo por mediación del subclón pGG5S6. Este plásmido contiene dos dianas de reconocimiento para la enzima *Eco* RI, por lo que la inserción del fragmento de extremos *Bsa* BI, *Eco* RI requirió un paso adicional. Se digirió pGG5S6 con las enzimas *Bsa* BI, *Dra* III; paralelamente se le sometió a una segunda digestión con las enzimas *Dra* III, *Eco* RI, obteniéndose un fragmento *Eco* RI-*Dra* III. C) En una reacción de triple ligación se unieron el vector pGG5S6 linealizado, el fragmento *Eco* RI/*Dra* III generado por la digestión de pGG5S6 con estas enzimas y el fragmento HC de extremos *Bsa* BI/*Eco* RI de los aislados españoles. El plásmido resultante se denominó pGG5S6HC. D) El fragmento obtenido por la digestión de pGG5S6HC con las enzimas *Pvu* II, *Sal* I se intercambió por el homólogo en los clones de genoma completo de PPV.

Para asegurarnos de que las construcciones no tuvieran alteraciones producidas durante su manipulación y ajenas a la secuencia sustituida, procedimos a restituir en los clones R3/3.3, R3/5.15, NAT/3.3 y NAT/5.15 su secuencia original, eliminando la región de HC de los aislados españoles. Para este procedimiento de “Marcha atrás” se extrajo de estos clones un fragmento de 3.662 nucleótidos comprendido entre las dianas *Pvu* II y *Sal* I que contenía la secuencia del HC 3.3 ó 5.15, además de la de P1 y P3. En su lugar se introdujo la región

homóloga obtenida a partir del subclon pGG5S6. Las nuevas construcciones se denominaron pMat-R3/3.3, pMat-R3/5.15, pMat-NAT/3.3 y pMat-NAT/5.15.

Los clones obtenidos se emplearon igualmente en experimentos denominados "de marcha atrás" en los que el fragmento *Pvu* II-*Sal* I (ver figura 5) que contiene la secuencia del HC de los aislados PPV 3.3 y 5.15 fue reemplazado por el original correspondiente al clon pGG5S6. Los plásmidos obtenidos se han designado como pMat-R3/3.3, pMat-R3/5.15, pMat-NAT/3.3 y pMat-NAT/5.15.

Una región de 2.395 nucleótidos comprendida entre las dianas de restricción *Rsr* II y *Dra* III (ver figura 5) que contiene la región codificadora del HC junto con parte de la P1 y de la P3 de los plásmidos pR3/3.3, pR3/5.15, pNAT/3.3 y pNAT/5.15 se ha intercambiado por la correspondiente en el clon pIC. Los clones obtenidos con este procedimiento, denominado de "marcha adelante", se han designado como pIC-R3/3.3, pIC-R3/5.15, pIC-NAT/3.3 y pIC-NAT/5.15 y fueron inoculados directamente en forma de ADN en planta.

14. CONSTRUCCIÓN DE QUIMERAS DE PPV QUE CONTIENEN EL GEN HC DE LOS AISLADOS PVY-0 AT Y PVY-0 NAT.

Se han creado virus quiméricos sustituyendo el HC de PPV en el plásmido pIC por el correspondiente de los aislados PVY 0 AT y PVY 0 NAT. El HC de PVY 0 NAT presenta un cambio aminoacídico en posición 334 (Lys por Asn) en el motivo KIRC al que se atribuye la pérdida de transmisibilidad por pulgones de este aislado (Canto *et al.*, 1995b; Llave, 1999). Las quimeras resultantes se han nombrado pQ-0AT y pQ-0 NAT, respectivamente y su construcción se representa en la figura 6. Los cebadores empleados en el clonaje aparecen en la tabla 2.

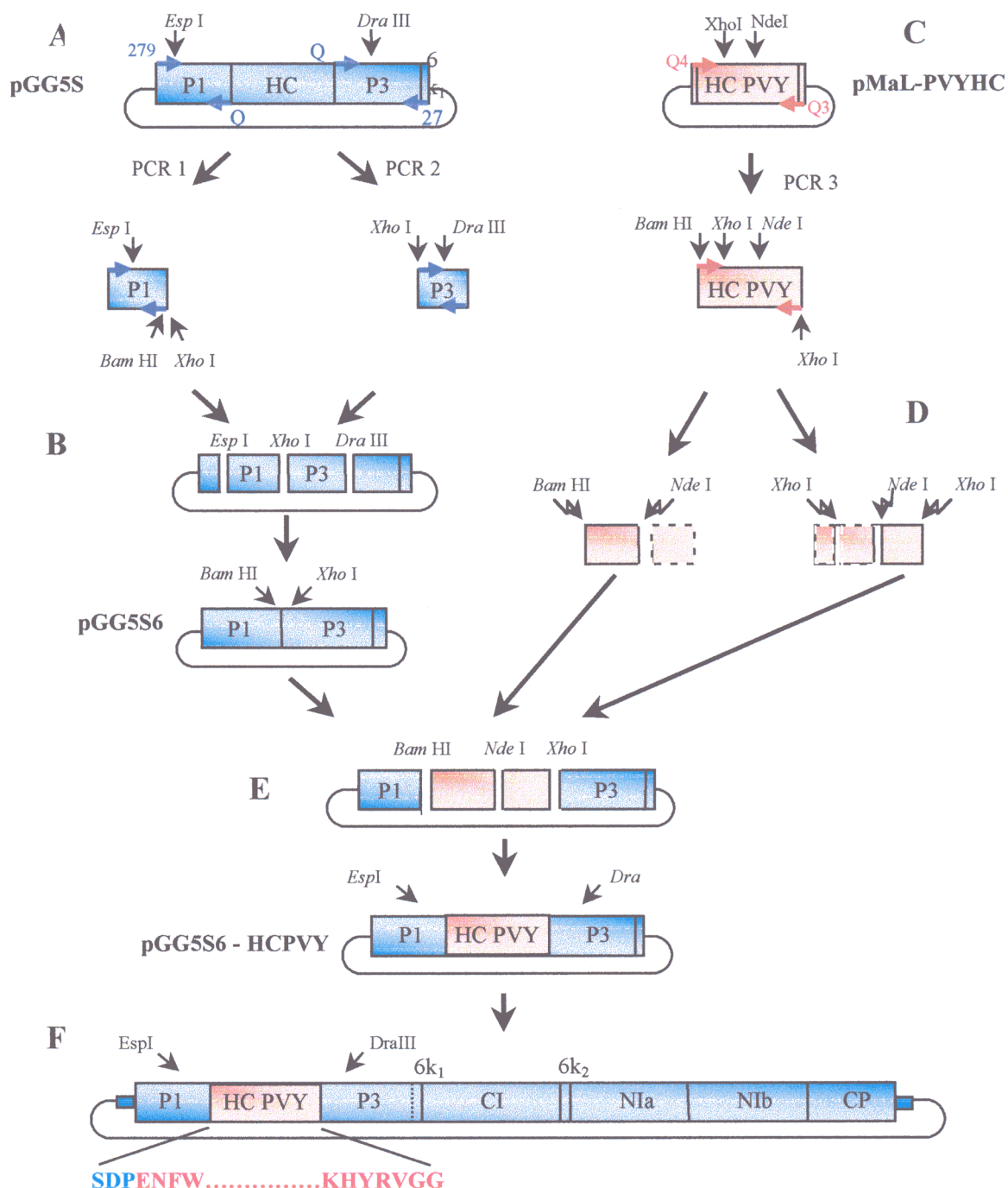


Figura 6. Esquema de la construcción de genomas quiméricos de PPV que contienen la secuencia del HC de los aislados PVY 0 AT y PVY 0 NAT.

La secuencia de los cebadores empleados así como su posición y dianas de restricción aparecen en la tabla 2.

A) Empleando como molde el subclon pGG5S6 de PPV Rankovik se amplificó el fragmento delimitado por los cebadores 279 y Q1 (PCR 1) y un segundo fragmento con los cebadores Q2 y 271 (PCR 2). Los productos amplificados se corresponden con las regiones del genoma de PPV que bordean la secuencia codificadora del HC. B) Estas secuencias amplificadas se digirieron con

los pares de enzimas de restricción *Esp* I/*Xho* I y *Xho* I/*Dra* III, respectivamente y se introdujeron en el plásmido pGG5S6 en una reacción de triple ligación. El clon resultante se denominó pGG5S6* y consistía en un plásmido pGG5S6 con una delección de la secuencia correspondiente al HC y con dos nuevas dianas de restricción (*Bam* HI, *Xho* I). C) A partir de clones disponibles en nuestro laboratorio (pMal-PVYHC) se amplificó la región codificadora del HC de PVY (PCR 3) empleando los cebadores Q3 y Q4 (tabla 2). Mutaciones en el cebador Q3 derivaron en la sustitución del dipéptido NA (PPV) por DP (PVY) en la secuencia SNAEN correspondiente al extremo amino terminal del HC de PVY. D) Este fragmento que contenía la secuencia de HC de PVY se introdujo en el vector pGG5S6* por medio de las enzimas *Bam* HI y *Xho* I, siendo necesario un paso intermedio a causa de la existencia de una diana interna *Xho* I: el fragmento se digirió con las enzimas *Bam* HI/*Nde* I y paralelamente con *Nde* I/*Xho* I. E) Las porciones *Bam* HI-*Nde* I de la primera digestión y *Nde* I-*Xho* I de la segunda se introdujeron en el vector pGG5S6* linearizado con las enzimas *Bam* HI y *Xho* I. El clon resultante se denominó pGG5S6-HC PVV. E) Finalmente, el clon pGG5S6-HC PVY se digirió con las enzimas de corte único *Esp* I y *Dra* III y el fragmento resultante, con la región quimérica, se sustituyó en el plásmido pIC de genoma completo de PPV Rankovik. Con este proceso se obtuvieron dos construcciones quiméricas que contenían la secuencia del HC del aislado PVY 0 AT (pQ-0AT) o bien la del aislado PVY 0 NAT (pQ-0NAT).

Tabla 2. Secuencias de los cebadores empleados en la construcción de las quimeras de PPV que contienen el HC de PVY.

NOMBRE ^a	POSIC. ^b	DIANA	SECUENCIA 5'-3' ^c
279 (+)	273	-	CTCTGCAGGAGAGCGGCCAAAAAGTCTC
Q1 (-)	1082	<i>Xho</i> I- <i>Bam</i> HI	ACCGCTCGAGGCCTGGATCCGAGTAGTGGATTATC
Q2 (+)	2443	<i>Xho</i> I	GAGGTCTCGAGGTGGATAAGTGTGAC
271 (-)	3045	-	TGTCGTACCTGCCTCC
Q3 (+)	1046	<i>Bam</i> HI	CTCGGATCCAGAGAATTTTGAAGG ^d
Q4 (-)	2407	<i>Xho</i> I	ATCTCGAGACCACCACTCTATAGTGTTTTATATCAG ^d

^a El signo (+) junto al nombre indica secuencia igual a la viral, mientras que el signo (-) indica secuencia complementaria a la viral.

^b Numeración de los cebadores 279, Q1, Q2 y 271 según Laín *et al.*, (1989) para el aislado PPV Rankovik. Los cebadores Q3 y Q4 se numeran atendiendo a la secuencia publicada para PVY 0 AT (Canto *et al.*, 1995b)

^c Las secuencias de las dianas de restricción aparecen señaladas en negrilla. Los nucleótidos subrayados representan las mutaciones diseñadas para generar dianas de restricción y, en el caso de Q3, cambio de aminoácido.

^d Los nucleótidos en cursiva pertenecen a la secuencia del HC de PVY, siendo el resto de PPV.

15. INOCULACIÓN DE PLANTAS CON CONSTRUCCIONES VIRALES

La inoculación de las construcciones descritas anteriormente se realizó en forma de transcritos de ARN (en el caso de los clones con un promotor transcripcional T7) o bien directamente en forma de ADN purificado (en el caso de las construcciones con un promotor 35 S).

15.1. Transcripción *in vitro* de ARN viral

Los clones de genoma completo de PPV conteniendo el promotor transcripcional T7 se digirieron con las enzimas *Pvu* II y *Pst* I para liberar un fragmento que contenía la secuencia codificadora del virus. Este producto de la digestión se analizó por electroforesis en gel de agarosa y se empleó como molde para una reacción de transcripción catalizada por la enzima T7 ARN polimerasa en presencia del cap-análogo m7GpppG (Kit de transcripción SP6/T7, Boehringer) (Dolja *et al.*, 1992). Una alícuota del producto de reacción se analizó en gel de agarosa al 1%.

15.2. Inoculación de transcritos de ARN en planta

El producto de transcripción se diluyó en un mismo volumen de tampón de inoculación de ARN (110 mM pirofosfato sódico pH 9, 3 mM EDTA, 3% p/v bentonita) y se aplicó manualmente sobre hojas de planta sana de *N. benthamiana* o *N. clevelandii* espolvoreadas con celite. Las plantas se lavaron y cubrieron con papel húmedo, como se describe en el apartado 4.

15.3. Inoculación de ADN purificado en planta

Entre 1 y 2 µg del plásmido pIC así como las construcciones pIC-R3/3.3, pIC-R3/5.15, pIC-NAT/3.3, pIC-NAT/5.15, pQ-0AT y pQ-0NAT se inocularon directamente sobre las hojas de modo manual como se indicó en el apartado anterior. En el caso de las quimeras pQ-0AT y pQ-0NAT la inoculación se realizó además empleando el sistema Helios Gene Gun (Bio Rad). El ADN purificado se precipitó sobre partículas de oro que a continuación se adhirieron al interior de pequeños cilindros plásticos que se dispusieron en el cargador de una pistola de helio. Cada cilindro contenía aproximadamente 1 µg de ADN y se descargó sobre dos hojas de una misma planta.

Las plantas empleadas en las inoculaciones fueron *N. benthamiana*, *N. clevelandii* y, ocasionalmente, *N. tabacum*, var. Xanthi.

16. ANÁLISIS DE LA PROGENIE VIRAL EN PLANTAS INFECTADAS

Con el fin de comprobar la estabilidad de las diferentes construcciones de PPV tras su inoculación en planta, se secuenciaron regiones de interés del genoma viral. Por otra parte, en plantas infectadas con las quimeras pQ-0AT y pQ-0NATse analizó el nivel de acumulación en planta de las proteínas HC y CP implicadas en el proceso de transmisión de virus por pulgones.

16.1. Confirmación de las construcciones virales

Las plantas inoculadas con las diferentes construcciones se analizaron por la técnica de ELISA-DASI para verificar la infección por PPV. Posteriormente se realizaron experimentos de IC-RT-PCR en los que se amplificaba la región correspondiente al HC (cebadores HC1 y HC2) y/o a la CP (cebadores CP 3 y CP4) de PPV. Los fragmentos amplificados con las secuencias completas para HC y CP se eluyeron de geles de agarosa y se secuenciaron para confirmar la identidad de dichas secuencias en la progenie viral.

En el caso de las plantas infectadas con las construcciones quiméricas se llevaron a cabo dos PCR diferentes. Para confirmar la naturaleza quimérica del virus en planta se emplearon los cebadores HC 9, de secuencia complementaria al ARN viral de PPV y el cebador HC PVY (5' CAAGCACCGTTCAAG 3'), (figura 7) de secuencia igual a la viral de PVY en la posición 1412 de su genoma (Robaglia *et al.*, 1989). Con estos cebadores se amplificaría un producto de 1075 nucleótidos de los cuales 996 pertenecerían a la porción carboxilo del HC de PVY y 79 al gen P1 de PPV. En una segunda PCR se emplearon los cebadores HC 2 y HC 9 que determinan la amplificación de un fragmento de 1525 nucleótidos que contiene el HC quimérico completo.

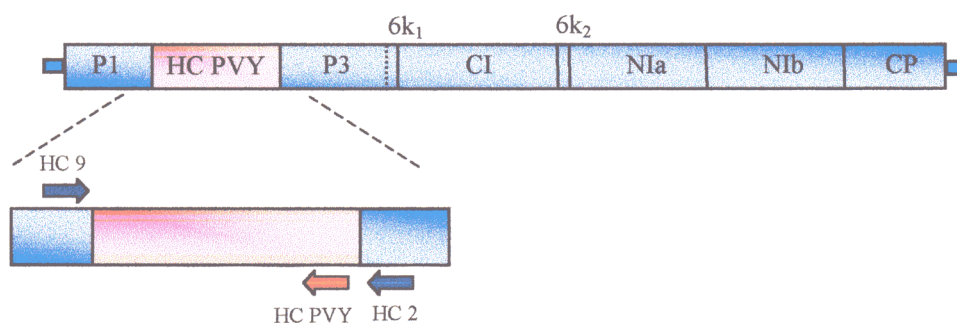


Figura 7. Posición en el genoma de las construcciones quiméricas de los cebadores empleados en IC-RT-PCR.

Las plantas infectadas con las construcciones quiméricas portadoras del gen HC de PVY se analizaron en ensayos Western blot para comprobar la expresión de la proteína HC en planta. Se emplearon los anticuerpos monoclonales para HC de PVY 8B9 y 1A11 (Canto *et al.*, 1995a) a una dilución 1/3000.

16.2. Análisis de acumulación de las quimeras de PPV en planta

Para obtener una estimación de la acumulación de los virus quiméricos en *N. benthamiana* se tomaron muestras a los 7, 15 y 30 días posteriores a la inoculación. Unos 200 mg de hoja situada 3 nudos por debajo de la hoja más joven infectada sistémicamente se trituraron en tres volúmenes de tampón 2X (Laemmli, 1970). Los macerados se hirvieron 5 minutos y posteriormente se centrifugaron 1 minuto a 12.000 rpm en microfuga.

Las proteínas del extracto se separaron por SDS-PAGE y se analizaron por Western blot empleando consecutivamente anticuerpos policlonales para HC de PVY y anticuerpos anti-conejo conjugados con peroxidasa.

RESULTADOS

1. Purificación de aislados de PPV. Análisis de las partículas virales por SDS-PAGE, Western blot y microscopía electrónica.

Las plantas de *N. benthamiana* inoculadas con los aislados PPV 3.3, 5.15 y R3-NAT presentaron síntomas de infección sistémica transcurridos 6 ó 7 días de la inoculación. En todos los casos los síntomas fueron los característicos de PPV para este huésped, con deformación y leve curvamiento de las hojas, amarilleamiento de nervios y aparición de manchas oscuras con ampollamiento (figura 8).



Figura 8. Síntomas observados en plantas de *N. benthamiana* infectada con PPV. A: síntomas 15 días después de la inoculación. B: Síntomas 40 días después de la inoculación.

Cuando el proceso de purificación de PPV incluía colchón y/o gradiente de sacarosa en los pasos finales, el rendimiento de las purificaciones osciló entre 50 y 500 μg de virus por cada 100 g de hoja, mientras que cuando se emplearon centrifugaciones adicionales el rendimiento varió entre 600 μg y 1 mg (figura 9).

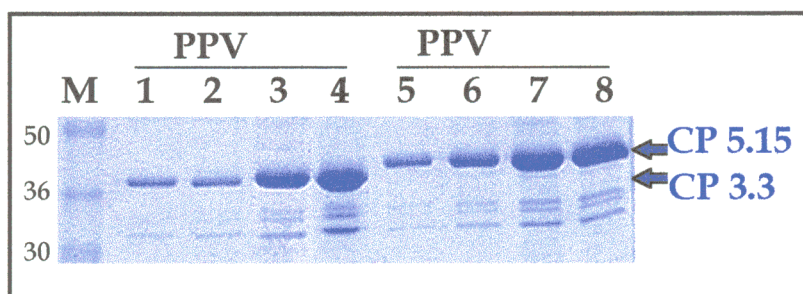


Figura 9. SDS-PAGE de preparaciones virales purificadas a partir de plantas infectadas con PPV 3.3 y PPV 5.15. M: marcadores de peso molecular (kDa), líneas 1 y 2: purificaciones de PPV 3.3 empleando gradiente de sacarosa, líneas 3 y 4: purificaciones de PPV 3.3 empleando ciclos adicionales de centrifugaciones, líneas 5 y 6: purificaciones de PPV 5.15 con gradiente de sacarosa, líneas 7 y 8: purificaciones de PPV 5.15 con ciclos adicionales de centrifugación.

Los aislados de PPV purificados mostraron diferente movilidad electroforética en SDS-PAGE. La CP de PPV 5.15 apareció como una banda de peso molecular aproximado de 40 kDa, mientras que en el caso los aislados PPV 3.3 y R3-NAT esta proteína presentó un peso molecular aparente de 36 kDa. Esta diferencia se corresponde con el hecho de que tanto PPV 3.3 como R3-NAT presentan una delección de 15 aminoácidos en el extremo amino terminal de su CP. El peso molecular de la CP de estos aislados calculado a partir de sus secuencias de aminoácidos (ver apdo. 4 de esta sección) fue de 37 kDa en el caso de PPV 5.15 y 35 kDa para PPV 3.3 y R3-NAT.

En las purificaciones de PPV aparecieron, en todos los casos, bandas de peso molecular inferior al de la CP, que en análisis Western blot se reconocieron por anticuerpos monoclonales frente a la CP de PPV (figura 10). Dichas bandas se deben a la degradación de la CP durante el proceso de purificación de virus, a pesar de emplear inhibidores de proteasas que reducen este efecto (López-Moya, 1993).

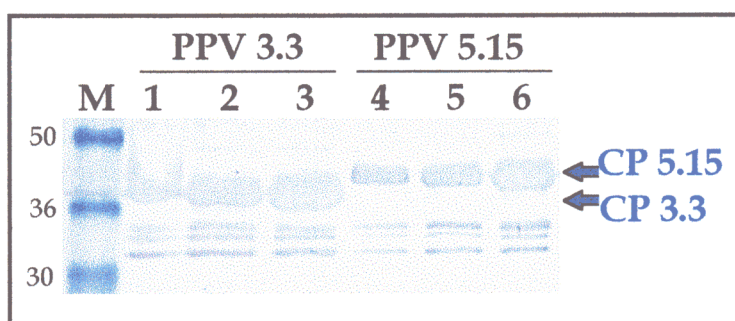


Figura 10. Análisis Western blot de preparaciones de virus purificado de los aislados PPV 3.3 y PPV 5.15. M: marcadores de peso molecular, líneas 1, 2 y 3: muestras de purificaciones de PPV 3.3, líneas 4, 5 y 6: muestras de purificaciones de PPV 5.15.

La observación al microscopio electrónico de los purificados de PPV en tinción negativa permitió visualizar partículas virales alargadas de un tamaño aproximado de 700 nm junto con fragmentos de menor tamaño resultado de la rotura de partículas virales durante el proceso de purificación.

2. Transmisión de aislados de PPV.

2.1. Transmisión planta a planta

Trabajos anteriores en nuestro laboratorio pusieron de manifiesto la falta de transmisibilidad por pulgones del aislado PPV 3.3 así como la transmisión de PPV 5.15 (López-Moya, 1995). Estos datos se han recogido en la tabla 4 junto con los resultantes de nuevos experimentos de transmisión para los aislados PPV R3 y R3-NAT.

Tabla 4. Transmisión por pulgones en experimentos planta a planta en *N. benthamiana*.

AISLADO	TRANSMISIÓN ^a	% TRANSMISIÓN
5.15	12/30 ^b	40 %
3.3	0/30 ^b	-
R3	5/56 ^c	8,92%
R3-NAT	0/50 ^c	-

^a Número de plantas infectadas sobre el total de plantas empleadas

^b Resultado de dos experimentos independientes

^c Resultado de cuatro experimentos independientes

Únicamente resultaron transmisibles por pulgones los aislados PPV 5.15 y R3, si bien en este último el porcentaje de transmisibilidad fue bajo (8,92%). Los aislados PPV 3.3 y R3-NAT, que comparten idéntica delección en el extremo amino terminal de su CP, no se transmitieron por pulgones en estos experimentos.

2.2. Transmisión a través de membranas

En ocasiones virus no transmisibles por pulgones en experimentos planta a planta han podido ser transmitidos empleando un sistema artificial de membranas en el que el virus purificado se complementa con un HC de un potyvirus transmisible. Este es el caso de PPV 3.3, cuya transmisión resulta positiva al intervenir en el proceso el HC de PVY N (López-Moya *et al.*, 1995), lo cual indica que la no transmisibilidad natural de este aislado podría deberse a una alteración en su HC más que a la delección de la CP.

Con el fin de comprobar si el comportamiento de PPV R3-NAT en transmisión resultaba similar al de PPV 3.3 se realizaron experimentos empleando

el sistema de membranas descrito con la participación del HC de PVY 0 AT parcialmente purificado. Las preparaciones del HC se analizaron previamente por análisis Western-blot para verificar la presencia de la proteína (figura 11).

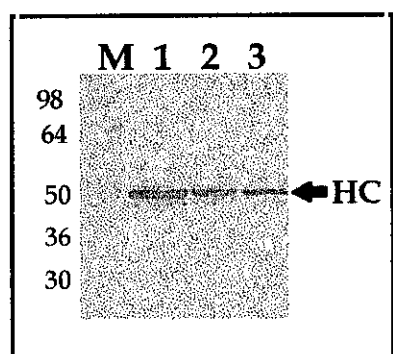


Figura 11. Análisis Western-blot del purificado final del HC del aislado PVY 0 AT. El HC aparece como una proteína de peso molecular aproximado de 50 kDa acompañada de bandas de menor peso que podrían corresponder a degradaciones del HC durante el proceso de purificación. Los carriles 1, 2 y 3 contienen diluciones 1/2, 1/5 y 1/10, respectivamente, de la purificación.

Al igual que ocurría con PPV 3.3, el aislado PPV R3-NAT resultó transmisible por pulgones al intervenir en el proceso un HC heterólogo funcional, mostrando, al igual que lo hiciera PPV 3.3, un porcentaje de transmisión superior al de PPV 5.15 (tabla 5).

Tabla 5. Transmisión por pulgones en experimentos de adquisición a través de membrana.

Solución de alimentación ^a				
Aislados PPV	µg virus /ml	HC PVY	Transmisión ^b	% Transmisión
5.15 ^b	200	-	0/12	-
	200	HC PVY-N	9/20	45
	100	HC PVY-N	5/18	27.77
3.3 ^b	200	-	0/12	-
	200	HC PVY-N	16/20	80
	100	HC PVY-N	4/18	22.22
R3-NAT	200	-	0/15	-
	200	HC PVY 0 AT	14/15	93.33
	150	HC PVY 0 AT	11/15	73.33

^a Las soluciones contenían PPV purificado, a la concentración indicada (µg/ml), junto con HC parcialmente purificado a partir de plantas infectadas con PVY-N o PVY 0 AT.

^b Datos de López-Moya *et al.*, 1995.

^c Número de plantas infectadas sobre el total de plantas empleadas.

Estos resultados sugerirían un defecto en el HC de los aislados transmisibles más que en su CP, a pesar de la delección que presenta esta última. En el caso de PPV R3-NAT al ser un virus producido en laboratorio, la única diferencia que posee con respecto al aislado transmisible PPV R3, del que deriva, es la delección de la CP.

3. Purificación parcial del HC de PPV.

En nuestro laboratorio se ha intentado la purificación total del HC de PPV con anterioridad sin llegar a obtener dicha proteína. Los anticuerpos policlonales para el HC de PPV obtenidos en nuestro laboratorio (ver siguiente apartado) nos ha permitido ahora analizar las diferentes etapas del proceso de purificación de esta proteína pudiendo detectar aquella o aquellas fracciones en las que queda localizada (figura 12)

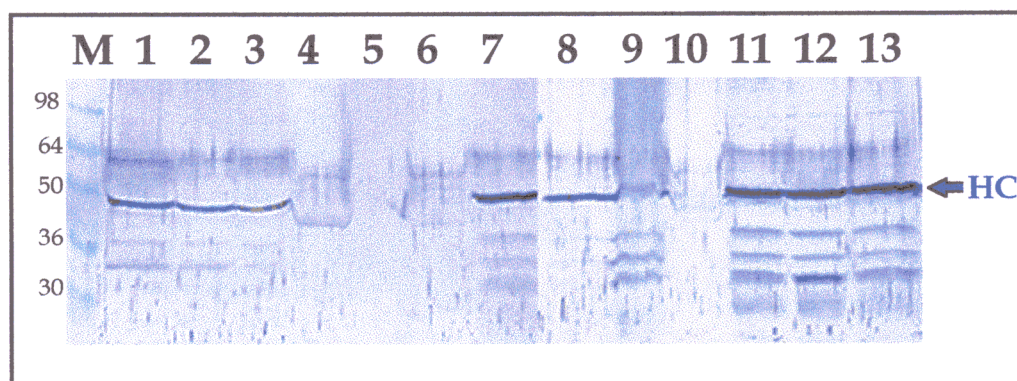


Figura 12. Análisis Western blot de las etapas de la purificación parcial del HC de PPV con anticuerpos policlonales para dicha proteína. El HC aparece como una banda próxima a 50 kDa. Los carriles del 1 al 13 se corresponden con las fracciones:

- 1: macerado inicial
- 2: macerado filtrado por gasa
- 3: sobrenadante tras clarificación
- 4: sobrenadante de ultracentrifugación del paso 3
- 5: sedimento tras ultracentrifugación del paso 3
- 6: sobrenadante tras precipitación con PEG y posterior centrifugación del paso 5
- 7: sedimento tras precipitación con PEG y posterior centrifugación del paso 5
- 8: sobrenadante de la clarificación del paso 7 resuspendido en TSM
- 9: sedimento de la clarificación del paso 7 resuspendido en TSM
- 10: sobrenadante tras la segunda precipitación con PEG y posterior centrifugación del paso 8
- 11: sedimento tras la segunda precipitación con PEG y posterior centrifugación del paso 8 (resuspendido en 1 ml de tampón TSM)
- 12: sedimento final tras clarificación de paso 11
- 13: sobrenadante tras clarificación de paso 11

El HC apareció como una banda de aproximadamente 50 kDa. Asimismo se detectaron proteínas de peso molecular inferior al HC y que podrían corresponder con degradaciones del mismo durante el proceso de purificación.

Se detectó HC en la fracción final de la purificación parcial (13), si bien una parte precipitó en la última clarificación (12). Esta proteína permaneció en el sobrenadante de las clarificaciones (3, 8) y en el sedimento tras ultracentrifugaciones (5) y precipitaciones con PEG (7, 11), si bien en la fracción número 5 no se aprecia con claridad en el Western.

4. Producción de anticuerpos policlonales para la proteína HC de PPV.

La purificación de la proteína HC de PPV se llevó a cabo por medio del sistema de purificación de proteínas de fusión de New England Biolabs. La proteína de fusión MBP-HC al igual que la MBP- β Gal, expresadas en bacteria, quedaban adheridas en una columna de amilasa, eluyéndose posteriormente por soluciones con concentraciones crecientes de maltosa. El HC se separó de la porción MBP por digestión con el factor Xa, para ser posteriormente aislada del resto de proteínas por medio de una columna de hidroxipatito. Este paso final no fue, sin embargo, posible debido probablemente a la desnaturalización de la proteína HC cuya elución de la columna de hidroxipatito no se consiguió aún con altas concentraciones de tampón fosfato sódico.

La proteína de fusión MBP-HC se purificó finalmente mediante electroelución a partir de geles de poliacrilamida, apareciendo en ensayos SDS-PAGE como una proteína de peso molecular próximo a 60 kDa (figura 13).

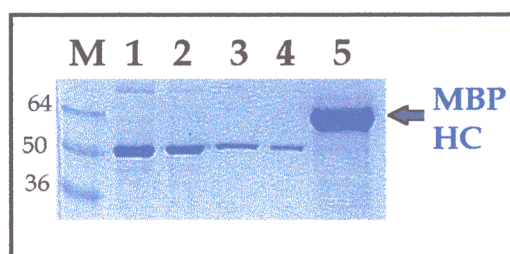


Figura 13. Análisis SDS-PAGE de la proteína MBP-HC tras su electroelución. M: marcadores de peso molecular (en kDa), líneas 1, 2, 3 y 4: 1 μ g, 500 ng, 200 ng y 100 ng, respectivamente, de proteína BSA. Línea 5: alícuota de la muestra purificada que contiene la proteína de fusión MBP-HC.

El suero obtenido de conejo a los siete y diez días de las inyecciones cuarta y quinta nos permitió comprobar que la mayor cantidad de anticuerpos para HC de PPV aparecía a los siete días de la inyección, disminuyendo ligeramente en los días posteriores. Por ello la sangría final se realizó transcurrido este período de la sexta inyección. El suero obtenido de esta sangría se limpió por inmunoabsorción y se empleó, con diferentes diluciones, en ensayos de electrotransferencia Western blot. Las diluciones 1/100 y 1/300 resultaron óptimas en este ensayo, siendo posible emplear diluciones mayores, del orden de 1/500 (figura 14)

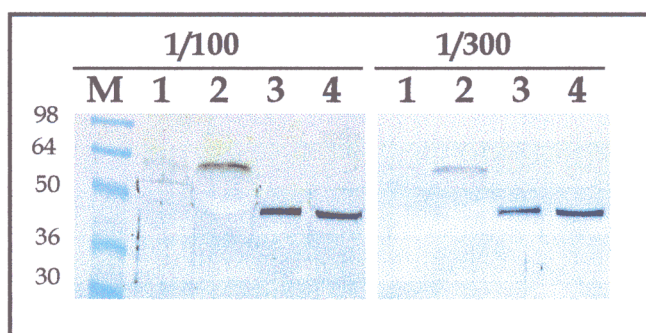


Figura 14. Ensayo Western blot con anticuerpos policlonales frente al HC de PPV. El suero inmunoabsorbido se empleó a diluciones 1/100 y 1/300. Líneas 1 y 2: extracto de *N. benthamiana* sana, línea 3: extracto de *N. benthamiana* infectada con PPV 5.15, línea 4: extracto de *N. benthamiana* infectada con PPV 3.3.

5. Análisis de la interacción CP-HC en membrana de nitrocelulosa.

La obtención de HC de PPV purificado así como de anticuerpos policlonales capaces de reconocer esta proteína nos han permitido llevar a cabo experimentos de interacción CP-HC con el fin de dilucidar si la pérdida de transmisibilidad del aislado PPV 3.3 pudiera deberse a la ausencia de unión de los viriones con el HC.

Los resultados obtenidos demuestran que la CP de PPV 3.3 así como de PPV 5.15 son capaces de unirse a HC tanto de PPV 5.15 como de PPV 3.3. (figura 15). La banda correspondiente a la CP de PPV 3.3 aparece con un peso molecular ligeramente inferior al de la CP de PPV 5.15 debido a la delección que dicha proteína presenta en su extremo amino terminal. En ensayos control en los que las membranas se incubaron exclusivamente con tampón no se detectó ninguna señal de interacción inespecífica.

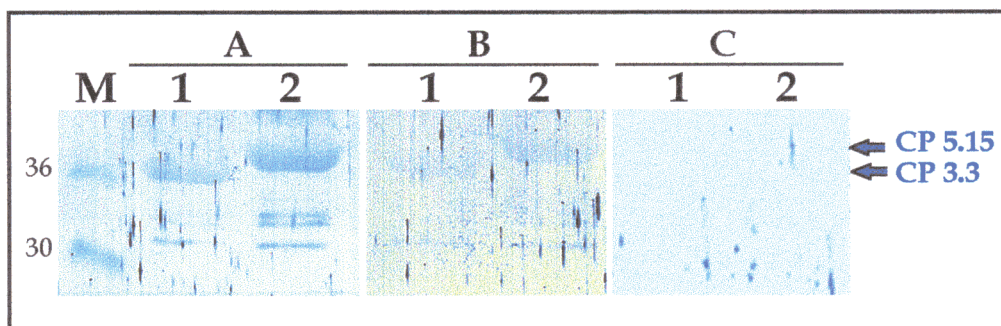


Figura 15. Ensayo de interacción CP-HC de PPV en membranas de nitrocelulosa. Línea M: marcadores de peso molecular (kDa), línea 1: CP de PPV 3.3, línea 2: CP de PPV 5.15. Figura A: membrana incubada con HC purificado de PPV 5.15, figura B: membrana incubada con HC purificado de PPV 3.3, membrana C: membrana control, incubada con tampón. La altura a la cual aparecen las bandas correspondientes a la CP de PPV 5.15 y PPV 3.3 se indican a la derecha.

En la figura 15 aparece una reacción más débil de los dos aislados de PPV en incubaciones con HC purificado de PPV 3.3. Estos resultados, todavía preliminares, parecen ser debidos a una menor concentración del HC de PPV 3.3 en la mezcla de incubación, aproximadamente tres veces por debajo de la empleada para HC de PPV 5.15.

Por tanto, a la vista de estos resultados, parece que la ausencia de transmisión de PPV 3.3 no puede ser atribuida a la falta de interacción de la CP viral con el HC.

6. Clonaje y secuenciación del gen HC de aislados españoles de PPV.

Con el fin de encontrar posibles alteraciones en la secuencia del HC de PPV 3.3 que pudieran explicar su pérdida de transmisibilidad por pulgones, se ha secuenciado dicha región. Paralelamente al clonaje y secuenciación del HC de este aislado se llevó a cabo el mismo proceso con PPV 5.15. En el caso de los aislados R3 y R3-NAT la secuencia del HC se obtuvo de los clones de genoma completo pR3 y pNAT.

Mediante las técnicas de RT/PCR se amplificaron fragmentos de aproximadamente 1.500 nucleótidos correspondientes al gen del HC de PPV 3.3 y 5.15 (figura 16).

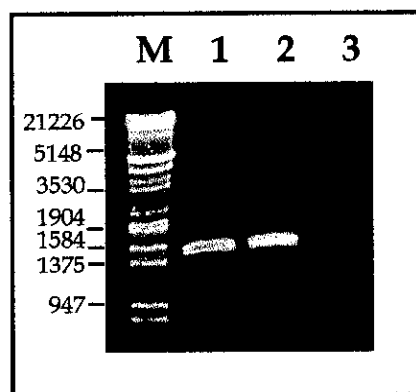


Figura 16. Amplificación por RT/PCR a partir de ARN viral de las regiones codificadoras del HC de PPV.

M: marcadores de peso molecular (λ Eco RI/Hind III)

1: HC amplificado del aislado PPV 5.15

2: HC amplificado del aislado PPV 3.3

3: amplificación control, sin ARN viral

Se obtuvieron nueve clones con la región codificadora del HC del aislado PPV 3.3 y cinco del aislado PPV 5.15. Las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de dichos clones se muestran en las figuras 17 y 18, respectivamente. Hemos establecido una secuencia consenso común a los dos aislados, de modo que en cada clon únicamente se indican las diferencias con respecto a dicha secuencia.

```

TACTCTGACCCAGGCAAACAATTTTGGGATGGTTTCACCAATTCATTTATGCAGTGCAAGCTACGCGAAACTGAT 1142
p1 HC3.3 .....
p2 HC3.3 .....
p3 HC3.3(A) .....
p3 HC3.3(B) .....
p4 HC3.3(A) .....
p4 HC3.3(B) .....
p5 HC3.3 .....
p6 HC3.3 .....
pHF HC3.3 .....
p1 HC5.15 .....
p2 HC5.15 .....
p3 HC5.15 .....
p4 HC5.15 .....
pHF HC5.15 .....

```

```

CATCAGTGACATCTGACCTGGACGTGAAGGAGTGTGGTTATGTGCGAGCACTTGTGTGCCAAGCGATAATCCCT 1217
p1 HC3.3 .....
p2 HC3.3 .....
p3 HC3.3(A) .....G.....
p3 HC3.3(B) .....
p4 HC3.3(A) .....
p4 HC3.3(B) .....
p5 HC3.3 .....
p6 HC3.3 .....C.....G.....
pHF HC3.3 .....
p1 HC5.15 .....
p2 HC5.15 .....
p3 HC5.15 .....
p4 HC5.15 .....
pHF HC5.15 .....

```

```

TGC GGAAAAATCACATGTCTGCAATGTGCTCAAAAGTATTCTTACATGTCACAACAGGAAATACGTGATAGATT 1292
p1 HC3.3 .....
p2 HC3.3 .....
p3 HC3.3(A) .....
p3 HC3.3(B) .....
p4 HC3.3(A) .....C.....
p4 HC3.3(B) .....
p5 HC3.3 .....
p6 HC3.3 .....
pHF HC3.3 .....
p1 HC5.15 .....
p2 HC5.15 .....
p3 HC5.15 .....
p4 HC5.15 .....
pHF HC5.15 .....

```


TCGACAGTAATTGAGCAGCATGAGAAAACAGTGATGGATAACTATCCACAATTTTCACATGTTCTCGCTTTTCTA 1367

p1 HC3.3
p2 HC3.3
p3 HC3.3(A)
p3 HC3.3(B)
p4 HC3.3(A)
p4 HC3.3(B)
p5 HC3.3
p6 HC3.3
pHF HC3.3
p1 HC5.15
p2 HC5.15
p3 HC5.15
p4 HC5.15
pHF HC5.15

AAGAGATATCGTGAACCTAATGCGCGTGGAAAATCAGAATTATGAAGCTTTCAGGATATCACGCACATGATAGGC 1442

p1 HC3.3
p2 HC3.3
p3 HC3.3(A)
p3 HC3.3(B)
p4 HC3.3(A)
p4 HC3.3(B)G.....
p5 HC3.3
p6 HC3.3
pHF HC3.3
p1 HC5.15
p2 HC5.15
p3 HC5.15
p4 HC5.15
pHF HC5.15

GAGCGTAAAGAAGCACCTTTTCCCATCTCAACAAAATCAATGAATTAATCATTAAAGGGTGGTATGATGAGCGCA 1517

p1 HC3.3A...A.....
p2 HC3.3
p3 HC3.3(A)
p3 HC3.3(B)T.....
p4 HC3.3(A)
p4 HC3.3(B)
p5 HC3.3
p6 HC3.3
pHF HC3.3
p1 HC5.15
p2 HC5.15
p3 HC5.15A.....
p4 HC5.15A.....
pHF HC5.15A.....

CAAGACTACATAGAAGCCTCGGATCATCTGCGCGAAGTAGCGCGATATCAGAAGAATCGCACGGAGAACATTAGG 1592

p1 HC3.3
p2 HC3.3
p3 HC3.3(A)
p3 HC3.3(B)
p4 HC3.3(A)A.....
p4 HC3.3(B)A.....
p5 HC3.3
p6 HC3.3
pHF HC3.3
p1 HC5.15
p2 HC5.15
p3 HC5.15
p4 HC5.15
pHF HC5.15

AGCGGATCTATAAAGGCTTTCAGGAATAAAATCTCATCAAAAGCACATGTCAATATGCAGCTTATGTGTGACAAT 1667

p1 HC3.3
p2 HC3.3G.....
p3 HC3.3(A)
p3 HC3.3(B)
p4 HC3.3(A)
p4 HC3.3(B)
p5 HC3.3
p6 HC3.3
pHF HC3.3
p1 HC5.15G.....
p2 HC5.15G.....
p3 HC5.15
p4 HC5.15
pHF HC5.15

CAACTTGATACTAATGGCAATTTTCGTGTGGGGACAGAGAGATATCATGCTAAACGCTTCTTTAGGAATTACTTC 1742

p1 HC3.3C.....

p2 HC3.3C.....

p3 HC3.3(A)C.....

p3 HC3.3(B)C.....

p4 HC3.3(A)C.....

p4 HC3.3(B)C.....

p5 HC3.3C.....

p6 HC3.3C.....

pHF HC3.3C.....

p1 HC5.15C.....

p2 HC5.15C.....

p3 HC5.15C.....

p4 HC5.15C.....

pHF HC5.15C.....

GATGTGATCGATGTTAGCGAGGGCTACAGACGTATATTGTTTCGTGAAATCCTAGAGGTATCCGCAAATTGGCC 1817

p1 HC3.3C.....

p2 HC3.3C.....

p3 HC3.3(A)C.....

p3 HC3.3(B)C.....

p4 HC3.3(A)C.....

p4 HC3.3(B)C.....

p5 HC3.3C.....

p6 HC3.3C.....

pHF HC3.3C.....

p1 HC5.15C.....

p2 HC5.15C.....

p3 HC5.15C.....

p4 HC5.15C.....

pHF HC5.15C.....

ATTGGCAACCTTGTTATGTCAACAAATCTGGCAGCACTACGTAAGCAGCTTTTGGGTGAAGAGTGCATTTCATTTT 1892

p1 HC3.3G.....

p2 HC3.3G.....

p3 HC3.3(A)G.....

p3 HC3.3(B)G.....

p4 HC3.3(A)G.....

p4 HC3.3(B)G.....

p5 HC3.3G.....

p6 HC3.3G.....

pHF HC3.3G.....

p1 HC5.15G.....

p2 HC5.15G.....

p3 HC5.15G.....

p4 HC5.15G.....

pHF HC5.15G.....

GAGGTCTCAAAGGAATGCACTAGCAAGCGAGGGGAAACTTTGTATACCAATGTTGCTGCGTCACACACGAAGAC 1967

p1 HC3.3G.....

p2 HC3.3G.....

p3 HC3.3(A)G.....

p3 HC3.3(B)G.....

p4 HC3.3(A)G.....

p4 HC3.3(B)G.....

p5 HC3.3G.....

p6 HC3.3G.....

pHF HC3.3G.....

p1 HC5.15C.....

p2 HC5.15C.....

p3 HC5.15C.....

p4 HC5.15C.....

pHF HC5.15C.....

GGTACACCACTGGAGTCTGAAATAATAAGTCCAACAAAGAATCATTTAGTTGTTGGTAACTCAGGTGATTCTGAAG 2042

p1 HC3.3A.....

p2 HC3.3A.....

p3 HC3.3(A)A.....

p3 HC3.3(B)A.....

p4 HC3.3(A)A.....

p4 HC3.3(B)A.....

p5 HC3.3A.....

p6 HC3.3A.....

pHF HC3.3A.....

p1 HC5.15A.....

p2 HC5.15A.....

p3 HC5.15A.....

p4 HC5.15A.....

pHF HC5.15A.....

```
TATGTGGATTGCCCCACAGCAAAAGGAGGTGCAATGTTTCATAGCAAAGGCAGGTTATGTTACATTAAACATTTTC 2117
p1 HC3.3 .....A.....
p2 HC3.3 .....
p3 HC3.3(A) .....
p3 HC3.3(B) .....
p4 HC3.3(A) .....
p4 HC3.3(B) .....
p5 HC3.3 .....
p6 HC3.3 .....
pHF HC3.3 .....
p1 HC5.15 .....
p2 HC5.15 .....
p3 HC5.15 .....
p4 HC5.15 .....
pHF HC5.15 .....G.....
```

```
CTTGCTATGCTGATCAACATAAATGAAGATGAAGCAAAAAGTTTCACAAAGACAGTGCGTGACACTCTTGTACCT 2192
p1 HC3.3 .....
p2 HC3.3 .....
p3 HC3.3(A) .....
p3 HC3.3(B) .....
p4 HC3.3(A) .....
p4 HC3.3(B) .....
p5 HC3.3 .....
p6 HC3.3 .....
pHF HC3.3 .....
p1 HC5.15 .....
p2 HC5.15 .....
p3 HC5.15 .....
p4 HC5.15 .....
pHF HC5.15 .....
```

```
AAGCTTGAACATGGCCATCGATGATGGACTTAGCTACAGCTTGCCACTTTCTCGCAGTTCTTACCCAGAAACT 2267
p1 HC3.3 .....
p2 HC3.3 .....
p3 HC3.3(A) .....
p3 HC3.3(B) .....
p4 HC3.3(A) .....
p4 HC3.3(B) .....
p5 HC3.3 .....
p6 HC3.3 .....
pHF HC3.3 .....
p1 HC5.15 .....
p2 HC5.15 .....
p3 HC5.15 .....
p4 HC5.15 .....
pHF_HC5.15 .....
```

```
CGGAATGCTGAGCTTCCACGAATACTCGTTGATCATGAAGCAAAAATCTTTCATGTAGTTGACTCATTGGATCA 2342
p1 HC3.3 .....
p2 HC3.3 .....
p3 HC3.3(A) .....G.....
p3 HC3.3(B) .....G.....
p4 HC3.3(A) .....
p4 HC3.3(B) .....
p5 HC3.3 .....
p6 HC3.3 .....
pHF HC3.3 .....C.....
p1 HC5.15 .....
p2 HC5.15 .....
p3 HC5.15 .....
p4 HC5.15 .....
pHF HC5.15 .....
```

```
CTGTCAACTGGAATGCATGTTTTGAAAGCGAACACAATCAATCAGCTTATTAGCTTTGCTAGTGATACATTGGAT 2417
p1 HC3.3 .....
p2 HC3.3 .....
p3 HC3.3(A) .....
p3 HC3.3(B) .....
p4 HC3.3(A) .....
p4 HC3.3(B) .....
p5 HC3.3 .....
p6 HC3.3 .....
pHF HC3.3 .....
p1 HC5.15 .....
p2 HC5.15 .....
p3 HC5.15 .....
p4 HC5.15 .....
pHF_HC5.15 .....A.....
```

```

TCAAATATGAAAACATACCTGGTTGGA
p1 HC3.3 .....C.....G.....
p2 HC3.3 .....
p3 HC3.3(A) .....
p3 HC3.3(B) .....
p4 HC3.3(A) .....G.....
p4 HC3.3(B) .....
p5 HC3.3 .....
p6 HC3.3 .....
pHF HC3.3 .....
p1 HC5.15 .....
p2 HC5.15 .....
p3 HC5.15 .....G.....
p4 HC5.15 .....G.....
pHF HC5.15 .....G.....

```

Figura 17. Secuencias nucleotídicas obtenidas para el HC de los aislados PPV 3.3 y 5.15. El número inicial con que se ha designado cada clon indica la PCR de la cual procede el cDNA clonado, de modo que cuando dos clones se han obtenido a partir de una misma PCR se diferencian como (A) o (B). Las diferencias encontradas en cada clon se indican bajo una secuencia consenso. Las mutaciones que determinan un cambio de aminoácido aparecen subrayadas. La presencia de un mismo residuo se indica por el símbolo ".". Numeración según Laín *et al.*, 1989.

```

YSDPGKQFWDGFTNSFMQCKLRETDHQCTSDLDVKECGYVAALVCQAIIPCGKITCLQCAQKYSYMSQQEIRDREFT 384
p1 HC3.3 .....
p2 HC3.3 .....
p3 HC3.3(A) .....G.....
p3 HC3.3 .....
p4 HC3.3(A) .....
p4 HC3.3(B) .....
p5 HC3.3 .....
p6 HC3.3 .....A.....R.....
pHF HC3.3 .....
p1 HC5.15 .....
p2 HC5.15 .....
p3 HC5.15 .....
p4 HC5.15 .....
pHF HC5.15 .....

VIEQHEKTVM DNYPQF SHVLAFLKRYRELMRVENQNYEAFKDITHMIGERKEAPF SHLNKINELI IKGGMMSAQDYI 461
p1 HC3.3 .....H.....
p2 HC3.3 .....
p3 HC3.3(A) .....
p3 HC3.3 .....
p4 HC3.3(A) .....
p4 HC3.3(B) .....D.....
p5 HC3.3 .....
p6 HC3.3 .....
pHF HC3.3 .....
p1 HC5.15 .....
p2 HC5.15 .....
p3 HC5.15 .....
p4 HC5.15 .....
pHF HC5.15 .....

EASDHLRELARYQKNRTENIRSGSIKAFRNKISSKAHVNMQLMCDNQLDTNGNEVWGQREYHAKREFRNYFDVIDVS 538
p1 HC3.3 .....
p2 HC3.3 .....
p3 HC3.3(A) .....L.....
p3 HC3.3 .....
p4 HC3.3(A) .....K.....
p4 HC3.3(B) .....Q.....
p5 HC3.3 .....
p6 HC3.3 .....
pHF HC3.3 .....
p1 HC5.15 .....
p2 HC5.15 .....
p3 HC5.15 .....
p4 HC5.15 .....
pHF HC5.15 .....D.....

```

	EGYRRHIVRENPRGIRKLAIGNLVMSTNLAALRKQLLGEECIHFEVSKECTSKRGENFVYQCCCVTHEDGTPLESEI	615
p1 HC3.3V.....	
p2 HC3.3	
p3 HC3.3 (A)R.....	
p3 HC3.3	
p4 HC3.3 (A)	
p4 HC3.3 (B)	
p5 HC3.3	
p6 HC3.3	
pHF HC3.3	
p1 HC5.15	
p2 HC5.15	
p3 HC5.15V.....A.....	
p4 HC5.15V.....	
pHF HC5.15V.....	
	ISPTKNHLVVGNSGDSKYVDLPTAKGGAMFIAGAGYCYINIFLAMLININEDEAKSFTKTVRDTLVPKLGTPSMMMD	692
p1 HC3.3S.....	
p2 HC3.3	
p3 HC3.3 (A)	
p3 HC3.3	
p4 HC3.3 (A)	
p4 HC3.3 (B)	
p5 HC3.3	
p6 HC3.3	
pHF HC3.3	
p1 HC5.15	
p2 HC5.15	
p3 HC5.15	
p4 HC5.15	
pHF HC5.15I.....	
	LATACHFLAVLYPETRNAELPRIIVDHEAKIFHVVDSEFGSLSTGMHVLKANTINQLISFASDTLDSNMKTYLVG	766
p1 HC3.3	
p2 HC3.3	
p3 HC3.3 (A)V.....	
p3 HC3.3	
p4 HC3.3 (A)C.....	
p4 HC3.3 (B)	
p5 HC3.3	
p6 HC3.3	
pHF HC3.3L.....	
p1 HC5.15	
p2 HC5.15	
p3 HC5.15	
p4 HC5.15	
pHF HC5.15	

Figura 18. Secuencias de aminoácidos de los clones con el HC de los aislados PPV 3.3 y 5.15. El número inicial con que se ha designado cada clon indica la PCR de la cual procede el cDNA clonado, de modo que cuando dos clones se han obtenido a partir de una misma PCR se diferencian como (A) o (B). Las diferencias encontradas en cada clon se indican bajo una secuencia consenso. La presencia de un mismo residuo se indica por el símbolo ".". Numeración según Laín *et al.*, 1989.

En los nueve clones del HC de PPV 3.3 se encontraron un total de 24 cambios nucleotídicos con respecto a la secuencia consenso establecida, 14 de los cuales dieron lugar a mutaciones en la secuencia de aminoácidos (tabla 6). En el caso de PPV 5.15 en los cinco clones secuenciados aparecieron 21 nucleótidos mutados que determinaron 6 cambios aminoacídicos (tabla 6). A la vista de estos datos se podría intuir en principio que, aunque la tasa de mutación nucleotídica parece superior para el aislado PPV 5.15 que para el 3.3, el número de mutaciones de aminoácidos de la proteína HC es más elevado en el caso de PPV 3.3.

Tabla 6. Resumen del número de diferencias nucleotídicas y aminoácidas encontradas en los clones de HC de PPV 3.3 y 5.15 con respecto a la secuencia consenso. En la columna derecha figuran los aminoácidos mutados en cada clon, indicándose la posición de los mismos y a continuación el nuevo aminoácido que ocupa dicha posición como consecuencia de la mutación.

Numeración según Laín et al., 1989.

CLON HC PPV	Nº CAMBIOS NUCLEÓTIDOS	Nº CAMBIOS AMINOÁCIDOS	AMINOÁCIDOS CAMBIADOS
p1 HC 3.3	8	3	L ₄₄₂ H, I ₅₈₀ V, G ₆₅₀ S
p2 HC 3.3	1	0	-
p3 HC 3.3 (A)	4	4	E ₃₄₃ G, F ₅₃₂ L, K ₅₉₁ R, I ₇₁₅ V
p3 HC 3.3 (B)	2	0	-
p4 HC 3.3 (A)	4	2	R ₄₈₂ K, Y ₇₆₃ C
p4 HC 3.3 (B)	2	2	N ₄₂₀ D, R ₄₇₂ Q
P5 HC 3.3	0	0	-
P6 HC 3.3	2	2	V ₃₄₁ A, Q ₃₅₃ R
pHF HC 3.3	1	1	F ₇₂₄ L
TOTAL	24	14	
p1 HC 5.15	1	0	-
p2 HC 5.15	1	0	-
p3 HC 5.15	6	2	I ₅₈₀ V, V ₅₉₇ A
p4 HC 5.15	5	1	I ₅₈₀ V
pHF HC 5.15	8	3	N ₅₁₄ D, I ₅₈₀ V, L ₆₂₃ I
TOTAL	21	6	

Todos los clones obtenidos presentaban al menos un cambio nucleotídico con respecto a la secuencia consenso, a excepción de p5HC 3.3. Los clones p1HC3.3, p3HC5.15, p4HC5.15 y pHF-HC5.15 coincidieron en los cambios nucleotídicos C₁₄₆₆A, T₁₇₃₆C, T₁₇₅₇C, A₁₈₈₄G y A₂₄₃₂G (figura 17). El nucleótido C₁₄₆₆ también aparece mutado en el clon p3 HC3.3(B) que presenta una T en esta posición (figura 17). De estos cambios, únicamente el A₁₈₈₄G determinó una mutación en la secuencia de aminoácidos de la proteína HC, apareciendo un residuo de Val en lugar de la Ile original (I₅₈₀V) (figuras 18). Los clones p2HC3.3, p1HC5.15 y p2HC5.15 coincidieron, por su parte, en el cambio nucleotídico A₁₆₃₁G (figura 17).

Tanto en el caso del HC de PPV 3.3 como en el del 5.15 las mutaciones de aminoácidos se disponían a lo largo de toda la secuencia proteica, como puede

verse en la figura 19 en la cual se representa en dos secuencias independientes los cambios encontrados en los clones de PPV 3.3 y PPV 5.15.

	YSDPGKQFWDGFTNSFMQCKLRETDHQCTSDLDVKECGYVAALVCQAIIPCGKITCLQCAQKYSYMSQQEIRDRFST	384
PPV 3.3A.G.....R.....	
PPV 5.15	
	VIEQHEKTVMDNYPQFSHVLAFLKRYRELMRVENQNYEAFKDITHMIGERKEAPFSHLNKINELIIGGMMSAQDYI	461
PPV 3.3D.....H.....	
PPV 5.15	
	EASDHLRELARYQKNRTENIRSGSIKAFRNKISSKAHVNMQLMCDNQLDTNGNFVWGQREYHAKRFFRNYFDVIDVS	538
PPV 3.3Q.....K.....L.....	
PPV 5.15D.....	
	EGYRRHIVRENPRGIRKLAIGNLVMSTNLAALRKQLLGEECIHFEVSKECTSKRGENFVYQCCCVTHEDGTPLESEI	615
PPV 3.3V.....R.....	
PPV 5.15V.....A.....	
	ISPTKNHLVVGNSGDSKYVDLPTAKGGAMFIAGAGYCYINIFLAMLININEDEAKSFTKTVRDTLVPKLGTPWSMMD	692
PPV 3.3S.....	
PPV 5.15I.....	
	LATACHFLAVLYPETRNAELPRILVDHEAKIFHVVDSEFGSLSTGMHVLKANTINQLISFASDTLDSNMKTYLVG	766
PPV 3.3V.....L.....C.....	
PPV 5.15	

Figura 19. Comparación entre los cambios aminoacídicos encontrados en los clones que contienen el HC de PPV 3.3 y de PPV 5.15.

Numeración según Laín *et al.*, 1989.

En los clones p3HC3.3 (A) y p6HC3.3 aparecen las mutaciones E₃₄₃G y V₃₄₁A, Q₃₅₃R, respectivamente localizadas en el interior de la región rica en cisteínas de la región amino terminal de la proteína HC, (figuras 18 y 19), si bien no afectan a los residuos conservados de Cys o His ni a ninguno de los aminoácidos del motivo KITC (figura 20).

El motivo conservado PTK implicado en transmisión de virus por pulgones tampoco se vió afectado por ninguna de las mutaciones encontradas en los diferentes clones de HC de PPV 3.3 y 5.15, si bien en el clon pHF HC5.15 apareció un cambio de Leu a Ile en posición 583 (figuras 19 y 20), siendo ambos aminoácidos hidrofóbicos y sin carga.

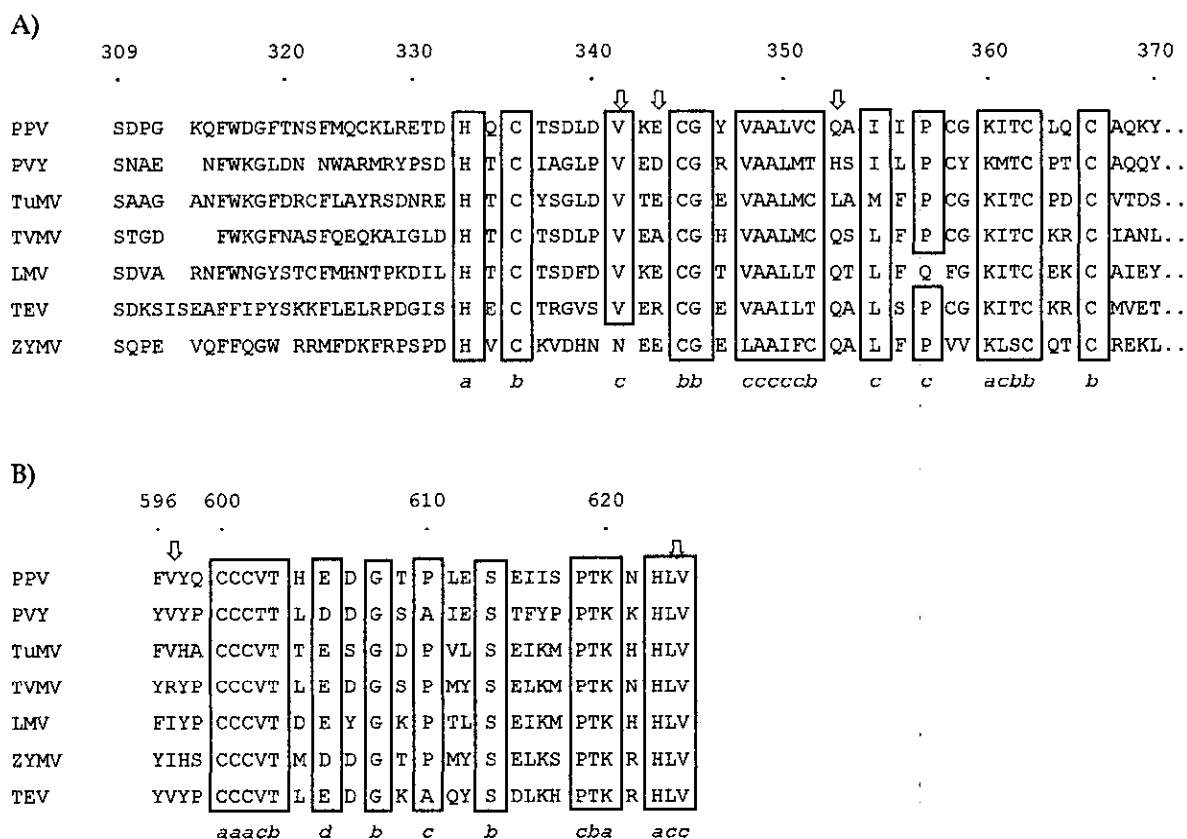
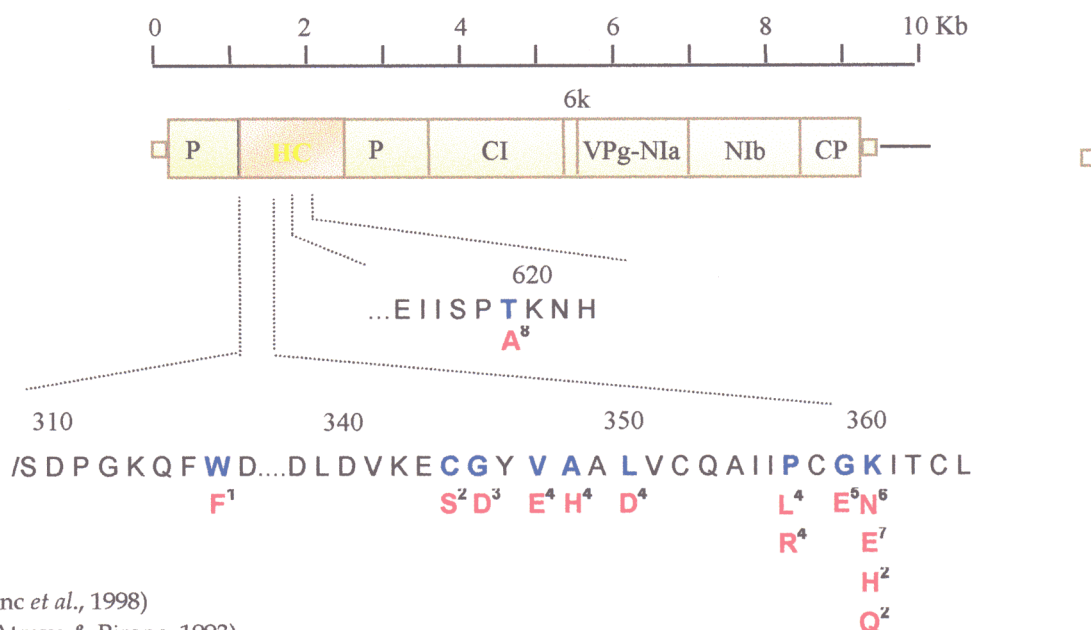


Figura 20. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de diferentes potyvirus correspondientes a las regiones del HC con residuos implicados en el proceso de transmisión por pulgones. Las posiciones de las mutaciones de los clones p3 HC3.3(A) y p6 HC 3.3 se señalan con una flecha. A) alineamiento de la región rica en Cys del extremo amino terminal del HC que contiene el motivo altamente conservado KITC. Posiciones 309 a 370. B) alineamiento de la región entre las posiciones 596 a 624 en la cual se encuentra el motivo PTK, altamente conservado.

a, aminoácido básico; b, aminoácido polar sin carga; c, aminoácido hidrofóbico apolar; d, aminoácido polar con carga negativa.

Numeración según Laín *et al.*, 1989 para PPV Rankovik.

Existen ciertos cambios aminoacídicos cuya mutación tiene como consecuencia la pérdida de transmisión por pulgones de diferentes potyvirus, y que no siempre afectan a los mencionados motivos KITC y PTK (figura 21). Las mutaciones de los distintos clones del HC no coincidieron tampoco con ninguno de estos residuos.



- 1: TEV (Blanc *et al.*, 1998)
- 2: TVMV (Atreya & Pirone, 1993)
- 3: PVY 1 (Canto *et al.*, 1995b)
- 4: TEV (Llave-Correas, 1999)
- 5: TuMV31 (Nakashima *et al.*, 1993)
- 6: PVY 0 NAT (Canto *et al.*, 1995b), TEV (Llave-Correas, 1999)
- 7: PVC (Thornbury *et al.*, 1990), TEV (Blanc *et al.*, 1998), TVMV (Atreya & Pirone, 1993), ZYMV R5PAT (Granier *et al.*, 1993)
- 8: ZYMV E15PAT (Granier *et al.*, 1993)

Figura 21. Resumen de las mutaciones del HC de potyvirus descritas como causantes de la pérdida de transmisibilidad por pulgones de diferentes aislados virales

En el clon pHFHC3.3 encontramos una mutación que afecta al aminoácido Phe en posición 724 del HC, apareciendo en su lugar una Leu (F₇₂₄L) (figuras 18 y 19). Este cambio afecta a una secuencia Lys-X-X-His-Val-Val-X-X-X-Gly que se ha encontrado en proteasas con centro activo de His (Oh y Carrington, 1989), si bien la mutación afecta a un aminoácido no conservado anterior a la His (figura 18) y supone un cambio entre residuos de iguales características (hidrofóbicos y sin carga).

En el clon p1HC 3.3 aparece un cambio del aminoácido Gly en posición 650 por un residuo de Ser (G₆₅₀S), siendo ambos aminoácidos polares y sin carga. El aminoácido Gly está muy conservado en potyvirus y junto a dos Tyr y una Cys forman el motivo GYCY (Gly-Tyr-Cys-Tyr) esencial en el autoproteólisis del extremo carboxilo del HC de la poliproteína viral (Oh y Carrington, 1989). En el clon p4HC3.3 (A) aparece un cambio de la Tyr en posición 763 que pasa a ser Cys (Y₇₆₃C) dentro del dominio YRVGG (Tyr-Arg-Val-Gly-Gly) que se ha visto resulta

igualmente esencial para la autoproteólisis del HC por su extremo carboxilo (Carrington *et al.*, 1989; Carrington y Herndon, 1992; Kasschau y Carrington, 1995).

7. Clonaje y secuenciación del gen CP de aislados españoles de PPV.

Empleando la metodología descrita en el apartado 11 de materiales y métodos se amplificaron fragmentos de aproximadamente 1.000 nucleótidos que contenían las secuencias de la CP de los aislados PPV 3.3 y 5.15 (figura 22).

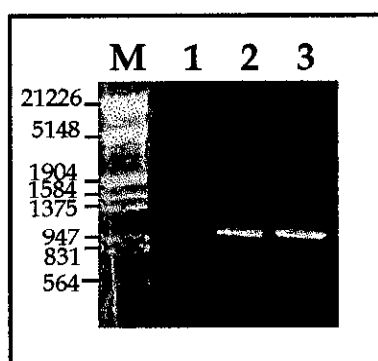


Figura 22. Amplificación por RT/PCR a partir de ARN viral de las regiones codificadoras de la CP de PPV.

M: marcadores de peso molecular (λ Eco RI/Hind III)

1: amplificación control, sin ARN viral

2: región CP amplificada del aislado PPV 3.3

3: región CP amplificada del aislado PPV 5.15

Se obtuvieron tres clones con la región codificadora de la CP del aislado PPV 3.3 y dos del aislado PPV 5.15. Las secuencias nucleotídicas y aminoácidas de dichos clones se muestran en las figuras 23 Y 24, respectivamente. Al igual que en el caso del HC, hemos establecido una secuencia consenso común a los dos aislados, de modo que en cada clon únicamente se indican las diferencias con respecto a dicha secuencia.

	GCTGACGAAAGAGAAGACGAGGAGGAAGTTGATGCAGGTAAGCCGATTGTAGCCACTGCACCGGCAGCAACTAGCCC	8653
1cp33 (A)	
1cp33 (B)	
2cp33	
1cp515	
2cp515	
	AATACTTCAACCACCTCCAGTCATACAGCCTGCACCCCGGACTACGGCGCCAATGCTCAACCCCATTTTCACGCCAG	8730
1cp33 (A)	
1cp33 (B)	
2cp33	
1cp515T...	
2cp515T...	
	CAACAACCTCAACCAGCAACAAAACAGTTTCACAGGTGTCAGGACCTCAACTGCAAACCTTTTGGACATATGGTAAT	8807
1cp33 (A)	
1cp33 (B)	
2cp33	
1cp515	
2cp515	

	GAGGATGCATCACCTAGCAACTCAAACGCGCTAGTCAACACAAACAGAGACAGGGACGTCGATGCAGGATCAATTGG 8884	
1cp33 (A)	
1cp33 (B)	
2cp33	
1cp515G.....	
2cp515	
	AACCTTTACAGTGCCACGTTTGAAGGCAATGACTTCAAACTATCTCTGCCAAAGGTGAAGGGAAAGGCTATTATGA 8961	
1cp33 (A)	
1cp33 (B)	
2cp33	
1cp515G.....A.....	
2cp515G.....A.....	
	ACTTGAACCATTTGGCACATTATAGTCCTGCACAGGTTGACTTGTCCAACACGAGAGCTCCGCAGTCTTGTTCCTCAA 9038	
1cp33 (A)	
1cp33 (B)	
2cp33	
1cp515C.....	
2cp515	
	ACTTGGTATGAAGGAGTTAAGCGAGATTATGATGTCAACGACGATGAAATGAGCATCATTTTAAATGGTCTTATGGT 9115	
1cp33 (A)	
1cp33 (B)	
2cp33	
1cp515	
2cp515	
	TTGGTGCATAGAGAATGGAACATCCCCGAATATCAATGGAATGTGGGTGATGATGGATGGGGAAACACAAGTGGAGT 9192	
1cp33 (A)	
1cp33 (B)	
2cp33	
1cp515	
2cp515	
	ATCCAATAAAGCCATTGTTGGATCATGCGAAACCCACTTTTACACAAATTATGGCACATTTTCAGTAACGTGGCTGAA 9269	
1cp33 (A)	
1cp33 (B)	
2cp33	
1cp515	
2cp515	
	GCGTATATTGAAAAACGAAATTATGAAAAAGCATACATGCCAAGGTATGGAATTCAGCGCAACCTGACAGACTACAG 9346	
1cp33 (A)	
1cp33 (B)	
2cp33	
1cp515	
2cp515	
	CCTCGCCAGATATGCCTTTGATTTTTACGAAATGACTTCAACGACACCCGTACGGGCACGTGAAGCTCATATCCAGA 9423	
1cp33 (A)	
1cp33 (B)	
2cp33	
1cp515	
2cp515	
	TGAAGGCAGCAGCATTGAGAAATGTTCAAAATCGTTTATTTGGCTTGGATGGAAACGTGCGAACACAAGAAGAGGAC 9500	
1cp33 (A)	
1cp33 (B)T.....	
2cp33T.....	
1cp515	
2cp515	
	ACAGAGAGACACACCGCTGGTGTGTTAATCGCAACATGCACAACCTCCTCGGTGTGAGGGGAGTG 9566	
1cp33 (A)	
1cp33 (B)	
2cp33	
1cp515T.....	
2cp515	

Figura 23. Secuencias nucleotídicas de los clones que contienen la región codificadora de la CP de los aislados PPV 3.3 y 5.15. El número inicial con que se ha designado cada clon indica la PCR de la cual procede el cDNA clonado, de modo que cuando dos clones se han obtenido a partir de una

misma PCR se diferencian como (A) o (B). Los cambios encontrados en los clones se indican bajo una secuencia consenso. Las mutaciones que determinaron un cambio en la secuencia de aminoácidos aparecen subrayadas. La presencia de un mismo residuo se indica con el símbolo "." y la falta de un aminoácido viene indicada por "-". Los nucleótidos señalados como "*" fueron específicos para cada aislado por lo que no se han considerado como mutaciones. Numeración según Laín *et al.*, 1989.

	ADEREDEEEVDAGKPIVATAPAATSPILQPPPVIQAPARTTAPMLNPIFTPATTQPATKPVSVSGPQLQTFGT	2885
1CP33(2)	
1CP33(8)	
2CP33	
1CP515(7)S.....	
2CP515S.....	
	GNEDASPSNSNALVNTNRDRDVGSGTFTVPRLKAMTSKLSLEPKVGKAIMNLNHLAHYSPAQVDLSNTRAPQ	2960
1CP33(2)	
1CP33(8)	
2CP33	
1CP515(7)G.....	
2CP515	
	SCFQTWYEGVKRDYDVTDDMSIILNGLMVWCIENGTSPTNINGMWVMDGETQVEYFIKPLLDHAKPTFRQIMAH	3035
1CP33(2)	
1CP33(8)	
2CP33	
1CP515(7)	
2CP515	
	FSNVAEAYIEKRNIEKAYMPRYGIQRNLTDYSLARYAFDFYEMTSTTPVRAREAHIQMKAALRNQNLFLGLDG	3110
1CP33(2)	
1CP33(8)V.....	
2CP33	
1CP515(7)	
2CP515	
	NVGTQEEDTERHTAGDVNRNMHNLGVRGV	3140
1CP33(2)	
1CP33(8)	
2CP33	
1CP515(7)V.....	
2CP515	

Figura 24. Secuencias de aminoácidos de los clones que contienen la región codificadora de la CP de los aislados PPV 3.3 y 5.15. El número inicial con el que se ha designado cada clon indica la PCR de la que procede el cDNA clonado, de modo que cuando dos clones se han obtenido a partir de una misma PCR se diferencian como (A) o (B). Los cambios encontrados en los clones se indican bajo una secuencia consenso. La presencia de un mismo residuo se indica por el símbolo "." y la falta de un aminoácido viene indicada por "-". El aminoácido señalado como "*" resultó específico para cada aislado, por lo que no se consideró como mutación. Numeración según Laín *et al.*, 1989.

En los tres clones secuenciados para la CP de PPV 3.3 aparecieron dos mutaciones nucleotídicas, una de las cuales se tradujo en un cambio de aminoácido (tabla 7). En el caso de PPV 5.15 fueron tres los cambios de nucleótidos

encontrados, dando lugar a dos mutaciones en la secuencia de aminoácidos de la CP.

Tabla 7. Resumen del número de diferencias nucleotídicas y aminoacídicas entre los clones de la CP de PPV 3.3 y 5.15. En la columna derecha aparecen los aminoácidos mutados indicándose la posición de los mismos y a continuación el nuevo aminoácido que ocupa dicha posición. Numeración según Laín et al., 1989.

CLON HC PPV	N° CAMBIOS NUCLEÓTIDOS	N° CAMBIOS AMINOÁCIDOS	AMINOÁCIDOS CAMBIADOS
p1 CP 3.3 (A)	0	0	-
p1 CP 3.3 (B)	1	1	A ₃₀₉₆ V
p2 CP 3.3	1	0	-
TOTAL	2	1	
p1 CP 5.15	3	2	R ₂₉₀₃ G, E ₃₁₂₀ V
p2 CP 5.15	0	0	-
TOTAL	3	2	

Las mutaciones de nucleótidos aparecieron en clones independientes y en ningún caso una misma mutación se repitió en dos clones. Los clones procedentes del aislado PPV 3.3 se diferenciaron de los obtenidos a partir del ARN de PPV 5.15 en los nucleótidos en posiciones 8727, 8921 y 8945 (figura 23). Una de estas diferencias de nucleótidos se tradujo en diferencia de aminoácido entre los dos aislados en la posición 2861 (figura 24). Estas diferencias entre clones se han atribuido a cambios específicos de cada aislado y no se consideran mutaciones.

Todos los clones obtenidos para el aislado PPV 3.3 presentaron una delección de 45 nucleótidos que determinó la falta de 15 aminoácidos en la región amino terminal de la CP. La delección afecta a una secuencia de aminoácidos DAG implicada en transmisión (Pirone, 1991; Atreya *et al.*, 1995, Blanc *et al.*, 1997; López Moya *et al.*, 1999) convirtiéndola en la secuencia DAL.

En el extremo amino terminal de la CP de PPV aparece un segundo motivo DAG en posición 2908 separado del primero por 84 aminoácidos (figura 25). En el caso de PPV 3.3 los dos motivos se separan únicamente por 66 aminoácidos debido a la delección de quince residuos localizada en esta región. La aparición de un

segundo motivo DAG o similar en la CP podría ser una característica común en potyvirus (figura 25) (López-Moya *et al.*, 1989). Estos motivos DAG se encuentran separados entre sí y del extremo amino de la proteína por un número variable de residuos para cada potyvirus.

	2811	2820	2830	2910
PPV	ADEREDEEE V	DAG K	PSV VTA.....RDRDV	DAG SIGT
PSbMV	AGDRKKREEST	DAS Q	FGS NRD.....SDRDV	DAG SSGT
PeMoV	SGDNKSKVE I	DAA A	AKL KEK.....KEPDV	DTG SQGI
TVMV	SDT V	DAG K	DKA RDQ.....KDKDV	NTG TSGT
TEV	SGT V	DAG A	DAG KKK.....KDRDV	NAG TSGT

Figura 25. Secuencias aminoacídicas de la región amino terminal de la CP de diferentes aislados de potyvirus: PPV (Laín *et al.*, 1989), PSbMV (Johansen *et al.*, 1991), PeMoV (Teycheney & Dietzgen, 1994), TVMV (Domier *et al.*, 1986) y TEV (Allison *et al.*, 1986). Los motivos DAG o similares aparecen en recuadros. Numeración según Laín *et al.*, 1989.

8. Clonaje de los genes HC de los aislados PPV 3.3 y 5.15 en clones de genoma completo de PPV.

8.1. Sustitución de la región HC de los clones pR3 y pNAT por la correspondiente de los aislados PPV 3.3 y PPV 5.15.

Con el fin de comprobar el efecto de las mutaciones encontradas en los clones de HC de los aislados PPV 3.3 y 5.15 sobre la transmisibilidad por pulgones de PPV se sustituyó la región correspondiente al HC de los clones pR3 y pNAT de genoma completo de PPV Rankovik por la obtenida de p1HC3.3 y p1HC 5.15. La proteína HC codificada en el clon p1HC3.3 contiene tres mutaciones de aminoácidos en su secuencia, una de las cuales supone un cambio de un aminoácido hidrofóbico y sin carga a uno nuevo hidrofílico y con carga positiva (L₄₉₀H). En las dos mutaciones restantes los nuevos aminoácidos mantienen las características de los originales (I₆₂₈V, G₆₉₈S). El efecto sobre la funcionalidad del HC de mutaciones en estas posiciones no es conocido, si bien el residuo de Gly 698 se integra en una secuencia GYCY (Gly-Tyr-Cys-Tyr) que se ha descrito como esencial para el autoprocésamiento del HC por su extremo carboxilo. La proteína HC codificada por el clon 1HC5.15 no contiene ninguna mutación.

Los clones pR3 y pNAT que contenían las secuencias descritas de PPV 3.3 y 5.15 se denominaron pR3/3.3, pR3/5.15, pNAT/3.3 y pNAT/5.15. Los resultados de infectividad de los transcritos obtenidos para dichos clones (figura 25) en planta se detallan en la tabla 8.

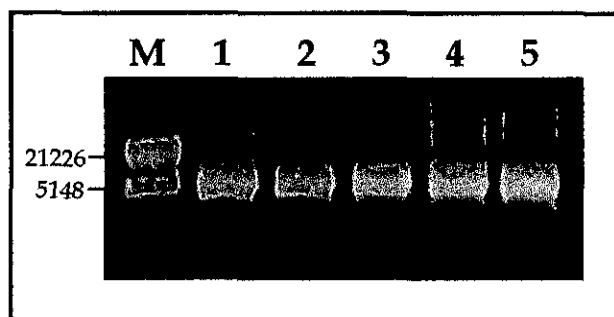


Figura 26. Transcripción reversa de las construcciones en los clones pR3 y pNAT. Línea M: marcadores de peso molecular, línea 1: transcripción control del clon pR3, línea 2: transcripción del clon pR3/3.3, línea 3: transcripción del clon pR3/5.15, línea 4: transcripción del con pNAT/3.3. línea 5: transcripción del clon pNAT/5.15.

Tabla 8. Inoculación de plantas de *N. benthamiana* con los transcritos obtenidos a partir de los clones pR3 y pNAT que contienen secuencias de HC de los aislados españoles PPV 3.3 y 5.15.

CONSTRUCCIONES ^a	INFECTIVIDAD
pR3 ^b	9/22 ^c (40,90%) ^d
pR3/3.3	0/22
pR3/5.15	0/26
pNAT/3.3	0/22
pNAT/5.15	10/22 (45,45%)

^a Cada una de las construcciones se obtuvo por duplicado en dos procesos independientes y se inocularon al menos en dos experimentos diferentes

^b El clon pR3 fue inoculado como control positivo

^c Número de plantas infectadas sobre el número total de plantas inoculadas

^d Entre paréntesis se indica el porcentaje de infectividad

Las construcciones pR3/3.3 y pNAT/3.3, que contenían el HC del aislado PPV 3.3 con las mutaciones L₄₉₀H, I₆₂₈V, G₆₉₈S, no fueron capaces de infectar planta

en ningún caso, por lo que posiblemente una o más de una de dichas mutaciones sean responsables de la ausencia de infectividad de esta construcción. El clon pR3/5.15 no fue capaz de infectar planta sana mientras el denominado pNAT/5.15 resultó infectivo en plantas de *N. benthamiana*, que mostraron síntomas similares a los de pR3 (figura 27). Tanto pR3/5.15 como pNAT/5.15 contienen una secuencia idéntica del HC del aislado PPV 5.15 por lo que la falta de infectividad de pR3/5.15 no podría atribuirse a dicha secuencia.

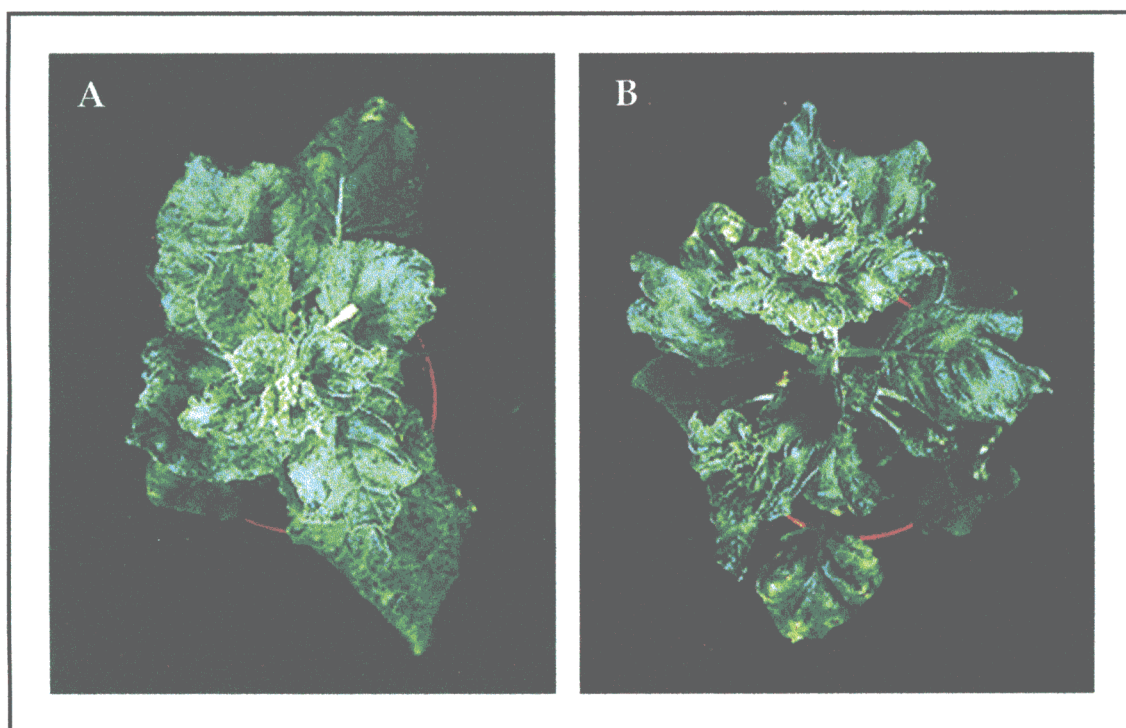


Figura 27. Síntomas en plantas de *N. benthamiana* inoculadas con: (A) plásmido control pR3, (B) construcción pNAT/5.15.

8.2. Comprobación “marcha atrás” para los clones pR3 y pNAT que contienen la secuencia HC de los aislados PPV 3.3 y 5.15.

La falta de infectividad de las construcciones pR3/3.3, pNAT/3.3 y pR3/5.15 podría estar relacionada con la secuencia de HC 3.3 o HC 5.15 que contienen o bien podría deberse a alguna alteración originada durante la manipulación de los clones y ajena a la región HC intercambiada. Mediante los experimentos denominados “de marcha atrás” se restituyó en los clones pR3/3.3, pNAT/3.3, pR3/5.15 y pNAT/5.15 la secuencia original del HC de PPV Rankovik, obteniéndose las construcciones denominadas pMat-R3/3.3, pMat-R3/5.15, pMat-NAT/3.3 y pMat-NAT/5.15. Los transcritos obtenidos a partir de estos nuevos clones resultaron

infectivos en todos los casos, a excepción de pMat-R3/5.15 (tabla 9), lo cual indica que la construcción pR3/5.15 posee alguna alteración fuera de la zona intercambiada del HC que afecta a la infectividad de la misma.

Tabla 9. Inoculación de plantas de *N. benthamiana* con transcritos de los clones de PPV Rankovik obtenidos por experimentos de "marcha atrás" a partir de las construcciones pR3/3.3, pR3/5.15, pNAT/3.3 y pNAT/5.15.

CONSTRUCCIONES "MARCHA ATRÁS"	INFECTIVIDAD EN PLANTA ^b
pR3 ^a	3/8 ^c
pMat-R3/3.3	1/8
pMat-R3/5.15	0/8
pMat-NAT/3.3	4/8
pMat-NAT/5.15	2/8

^a El clon pR3 se transcribió a ARN y se inoculó como control positivo

^b Resultados de dos inoculaciones independientes

^c Número de plantas infectadas sobre el número total de plantas inoculadas

El hecho de que en las construcciones pR3/3.3 y pNAT/3.3 al sustituir el HC 3.3 por el de Rankovik los clones resulten infectivos (pMat-R3/3.3, pMat-NAT/3.3), indica que en este caso el HC 3.3 es el causante de la pérdida de infectividad en los clones pR3/3.3 y pNAT/3.3.

8.3. Comprobación "marcha adelante" para los clones pR3 y pNAT que contienen la secuencia HC de los aislados PPV 3.3 y 5.15.

El clon pIC ofrece diversas ventajas frente a pR3 y pNAT por tratarse de un clon que permite su inoculación en forma de ADN, mostrando una infectividad del 60% para dosis de 0,5 a 1 µg de ADN, y próxima al 80% para dosis de 1,5 a 2 µg de ADN (López-Moya, comunicación personal) frente a una infectividad del 49% conseguida con transcritos de ARN del clon pR3 (Riechmann *et al.*, 1990).

La región codificadora del HC del clon pIC se sustituyó por la homóloga obtenida a partir de los clones pR3/3.3, pR3/5.15, pNAT/3.3 y pNAT/5.15 en experimentos denominados "de marcha adelante". Las construcciones resultantes se designaron pIC-R3/3.3, pIC-R3/5.15, pIC-NAT/3.3 y pIC-NAT/5.15, si bien en

este caso la nomenclatura NAT hace referencia a la delección de la CP de los clones NAT/3.3 y NAT/5.15 a partir de los que se ha obtenido el HC, no apareciendo tal delección en las construcciones en pIC. La inoculación de los nuevos clones puso de manifiesto la falta de infectividad de pIC-R3/3.3 y pIC-NAT/3.3 que contenían la secuencia del HC del aislado PPV 3.3 (tabla 10).

Tabla 10. Inoculaciones en planta de *N. benthamiana* de las construcciones “marcha adelante” en el plásmido pIC.

CONSTRUCCIONES EN EL CLON pIC	INFECTIVIDAD EN PLANTA ^b	% INFECTIVIDAD EN PLANTA
pIC ^a	15/20 ^c	75
pIC-R3/3.3	0/19	-
pIC-R3/5.15	13/19	68.42
pIC-NAT/3.3	0/19	-
pIC-NAT/5.15	14/19	73.68

^a El clon pIC se inoculó como control positivo (entre 1 y 1,5 µg ADN/planta)

^b Todas las construcciones se inocularon en tres experimentos independientes (1µg ADN/planta)

^c Número de plantas infectadas sobre el número total de plantas inoculadas

Estos resultados indican que las mutaciones que contiene la secuencia de HC 3.3 afectan a alguna de las funciones de la proteína HC, impidiendo la infectividad del virus. Los clones pIC que contienen la secuencia HC 5.15 han resultado infectivos, mostrando síntomas iguales a los que aparecían en la infección con pIC (figura 28).

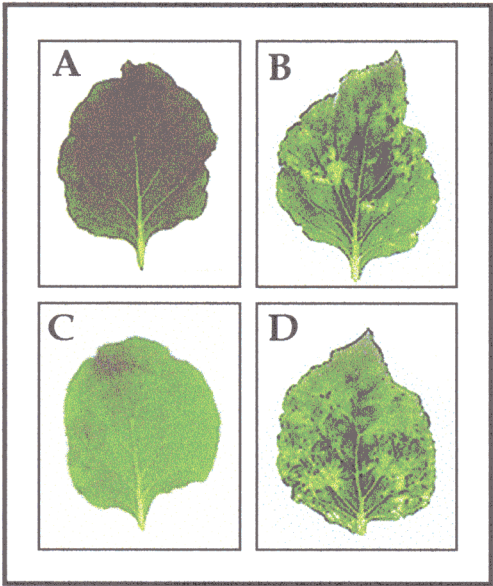


Figura 28. Hojas de *N. benthamiana* mostrando síntomas de inoculación con las construcciones en plásmido pIC. A.: planta sana. B: planta inoculada con el plásmido pIC (control de inoculación). C: planta inoculada con la construcción pIC-R3/3.3. D: planta inoculada con la construcción pIC-R3/5.15

El porcentaje de infectividad del clon pIC fue de un 75% para dosis de inóculo entre 1 y 1,5 μ g de ADN, resultado esperado de acuerdo con los datos de infectividad existentes para este clon (López-Moya, comunicación personal). Las construcciones pIC-R3/5.15 y pIC-NAT/5.15 mostraron porcentajes de infectividad de 68,42% y 73,68%, respectivamente, para dosis similares de inóculo, resultado equiparables al encontrado para el control pIC, si bien con el número de datos de que se dispone estos resultados serían únicamente orientativos.

9. Transmisión de las construcciones en clones completos de PPV.

Las plantas infectadas con las construcciones pNAT/5.15 se emplearon como fuente de virus en experimentos de transmisión por pulgón planta a planta. El resto de las construcciones en los clones pR3 y pNAT no pudieron ser ensayadas en transmisión al no resultar infectivas. Las plantas infectadas con las construcciones pIC-R3/5.15 y pIC-NAT/5.15 se utilizaron igualmente en experimentos de transmisión. Los resultados figuran en la tabla 11.

Tabla 11. Transmisiones por pulgones en experimentos planta a planta a partir de *N. benthamiana* infectadas con las construcciones pNAT/5.15, pIC-R3/5.15 y pIC-NAT/5.15.

CONSTRUCCIONES ^a	TRANSMISIÓN ^b	% TRANSMISIÓN
pR3	1/41 ^c	2,43
pNAT	0/54 ^c	-
pNAT/5.15	0/56 ^c	-
pIC	1/29 ^d	3,44
pIC-R3/5.15	12/28 ^d	42,85
pIC-NAT/5,15	10/22 ^d	45,45

^a pNAT y pIC se han empleado como controles en la transmisión por tratarse de los clones empleados para crear las construcciones. pR3 se empleó como un control complementario.

^b Número de plantas infectadas sobre el número total de plantas inoculadas

^c Resultado de tres experimentos independientes

^d Resultado de dos experimentos independientes

Las transmisiones a partir de plantas infectadas con pNAT/5.15 fueron negativas. Cuando el HC 5.15 aparecía en un genoma pIC (pIC-R3/5.15 y pIC-NAT/5.15) la transmisión resultó positiva. Conviene recordar que la construcción

pIC-NAT/5.15 posee una CP completa y que las siglas NAT hacen referencia al clon pNAT/5.15 del que procede la secuencia del HC. Por tanto la no transmisión de pNAT/5.15 parece deberse a una causa ajena a la secuencia del HC, como podría ser la delección que este clon contiene en su CP. Esto parece contradecir los resultados conseguidos en experimentos de transmisión por sistema artificial de membrana de los aislados PPV 3.3 y PPV R3-NAT (ver apdo. 2.2 de esta sección) en los cuales dichos aislados se transmitían por pulgones cuando intervenía en el proceso un HC funcional de otro potyvirus, el PVY.

Por otra parte, llama la atención el hecho de que en los casos en que el clon pIC contiene la secuencia del HC del aislado PPV 5.15 (pIC-R3/5.15 y pIC-NAT/5.15) la transmisión por pulgones se ve notablemente incrementada (tabla 11). La comparación de las regiones codificadoras del HC del clon pIC así como de pIC-R3/5.15 y pIC-NAT/5.15, con el fin de encontrar alguna diferencia entre ellas que explicase el distinto comportamiento en transmisión, puso de manifiesto la existencia de dos aminoácidos diferentes entre el HC de pIC y el HC 5.15 que contienen pIC-R3/5.15 y pIC-NAT/5.15 (figura 29).

pIC	SDPGKQFWDGFTNSFMQCKLRETDHQCTSDLDVKECGYVAALVCQAIIPCGKITCLQCAQKYSYMSQQEIRDRETV	385
pIC-R3/515	
pIC	IEQHEKTVMDNYPQFQSHVLAFLKRYRELMRVENQNYEAFKDITHMIGERKEAPFSHLNKINELIIKGGMMSAQDYIE	462
pIC-R3/515	
pIC	ASDHLRELARYQKNRTENIRSGSIKAFRNKISSKAHVNMQLMCDNQLDTNGNFVWGQREYHAKRFFRNYFDVIDVSE	539
pIC-R3/515	
pIC	GYRRHIVRENPKGIRKLAIGNLVMSTNLAAALRKQLLGEECIHFEVSKECTSKRGENFVYQCCCVTHEDGTPLESEII	616
pIC-R3/515R.....	
pIC	SPTKNHLVVGNSGDSKYVDLPTAKGGAMFIKAGYCYINIFLAMLININEDEAKSFTKTVRDTLVPKLGTWPSMMDL	693
pIC-R3/515	
pIC	ATACHFLAILYPETRNAELPRILVDHEAKIFHVVDSEFSLSTGMHVLKANTINQLISFASDTLDSNMKTYLVG	766
pIC-R3/515V.....	

Figura 29. Comparación de la secuencia correspondiente al HC de los clones pIC y pIC-R3/5.15.

En la posición 551 del HC de pIC aparece un aminoácido Lys mientras que en el HC 5.15 de pIC-R3/5.15 y pIC-NAT/5.15 encontramos una Arg en la misma posición, siendo ambos aminoácidos básicos e hidrofílicos. El segundo cambio se localiza en la posición 702 ocupada por una Val en el caso del HC de pIC y por una Ile en el HC de pIC-R3/5.15 y pIC-NAT/5.15.

Paralelamente se llevó a cabo la secuenciación de la región codificadora de la CP de los clones pIC, pIC-R3/5.15 y pIC-NAT/5.15. La CP, en principio, debería ser idéntica en los tres clones, ya que pIC-R3/5.15 y pIC-NAT/5.15 se obtuvieron a partir del clon pIC por modificaciones en la región 5' de su genoma, y en ningún caso de la CP. Como era de esperar, no se encontró ninguna diferencia entre las regiones de la CP de los tres clones.

10. Construcción de las quimeras PPV-HC PVY.

El hecho de que los aislados PPV 3.3 y R3-NAT, no transmisibles por pulgones, así como PPV 5.15 sean capaces de transmitirse al intervenir en el proceso un HC funcional de PVY hace suponer que la expresión de dicho HC en PPV posibilitaría la transmisión de los diferentes aislados de PPV. Con el fin de comprobar este punto se procedió a sustituir la región codificadora del HC en clones de genoma completo de PPV Rankovik (pIC) por la correspondiente a aislados de PVY. El clon pIC se ha seleccionado frente a pR3 y a pNAT por ser de manejo más fácil y por presentar un porcentaje de infectividad en planta superior al de éstos. Este clon no presenta la delección de la CP de PPV 3.3 y R3-NAT.

La sustitución de la secuencia codificadora del HC en el clon pIC por la homóloga de PVY dio lugar a un HC quimérico compuesto por 451 aminoácidos de los cuales los 3 iniciales corresponden a la secuencia de PPV mientras que el resto pertenecen al HC de los aislados PVY 0 AT o PVY 0 NAT, denominándose por ello quimeras pQ-0AT y pQ-0NAT, respectivamente (figura 6, materiales y métodos).

Los clones pQ-0AT y pQ-0NAT se emplearon para inocular plantas de *N. benthamiana*, *N. clevelandii* y *N. tabacum* var. Xanthi siguiendo los procedimientos de inoculación mecánica tradicional y/o inoculación por disparo con pistola de helio (Gene Gun) (apdo. de Materiales y Métodos). Las dos construcciones resultaron infectivas en plantas de *N. benthamiana*, mientras que en *N. clevelandii* la quimera pQ-0NAT no consiguió infectar ninguna planta, con el número de ensayos realizados (tabla 12). Ninguna de las dos quimeras infectó plantas de tabaco.

En inoculaciones mecánicas el clon pQ-0AT no infectó en ningún caso, mientras que pQ-0NAT logró infectar una planta de *N. benthamiana*. En inoculaciones con el sistema Gene Gun la situación fue la inversa, resultando infectivo únicamente el clon pQ-0AT, si bien la dosis de inóculo fue doble a la empleada para pQ-0NAT.

Ninguna de las quimeras infectó plantas de *N. tabacum* var. Xanthi, huésped de PVY pero no de PPV.

Tabla 12. Inoculación de las quimeras PPV-HC PVY en planta.

INOCULACIÓN DE CONSTRUCCIONES	ADN INOCULADO ^c	PLANTAS INOCULADAS		
		<i>N. benthamiana</i>	<i>N. clevelandii</i>	Xanthi
Mecánica ^a				
pIC	1 µg	9/11	-	0/2
pQ-0AT	2 µg	0/19	-	0/5
pQ-0NAT	2 µg	1/19	-	0/5
Gene Gun ^b				
pIC	0.015 µg	1/1	3/3	-
pQ-0AT	1 µg	1/1	2/8	-
pQ-0NAT	0.5 µg	0/1	0/8	-

^a Las inoculaciones en *N. benthamiana* se realizaron en tres experimentos diferentes mientras que los datos en *N. tabacum* var. Xanthi corresponden a una única inoculación. El clon pIC se empleó como control positivo de la inoculación.

^b Resultados de un único experimento. El clon pIC se inoculó como control positivo.

^c µg de ADN de cada construcción inoculados por planta. En el caso de pQ-0NAT la cantidad obtenida para cada inoculación con el sistema Gene Gun fue aproximadamente la mitad que para pQ-0AT.

El símbolo “-” indica ensayos que no se han llevado a cabo.

Las plantas infectadas se emplearon como inóculo para una nueva inoculación en lo que hemos denominado inoculación de “primer pase”. A su vez, las plantas infectadas en este “primer pase” se emplearon como inóculo en un “segundo pase”. Los datos obtenidos de estos experimentos aparecen en la tabla 13

Tabla 13. Inoculación de las construcciones quiméricas en planta sana a partir de plantas infectadas con preparaciones de ADN.

CONSTRUCCIONES INOCULADAS	PLANTAS INOCULADAS ^c		
	<i>N. benthamiana</i> ^c	<i>N. clevelandii</i> ^c	<i>N. tabacum</i> xanthi
1^{er} Pase^a			
PIC	8/8	4/9	0/4
pQ-0AT	9/12	0/11	0/4
pQ-0NAT	1/11	0/11	0/4
2^o Pase^b			
pIC	7/7	-	-
pQ-0AT	17/23	-	-
pQ-0NAT	2/8	-	-

^a Como inóculo se emplearon plantas infectadas a partir de preparaciones de ADN.

^b Como inóculo se emplearon las plantas infectadas en el pase 1.

^c Resultados de tres experimentos diferentes.

El símbolo “-” indica ensayos que no se han llevado a cabo.

Las progenies virales derivadas de pQ-0AT y pQ-0NAT en las plantas empleadas como inóculo infectaron *N. benthamiana* en inoculaciones mecánicas (tabla 13), mientras que la inoculación en *N. clevelandii* y *N. tabacum* resultó negativa. En el caso de la progenie viral del plásmido pIC la inoculación resultó positiva en *N. benthamiana* y *N. clevelandii*, pero no así en *N. tabacum*.

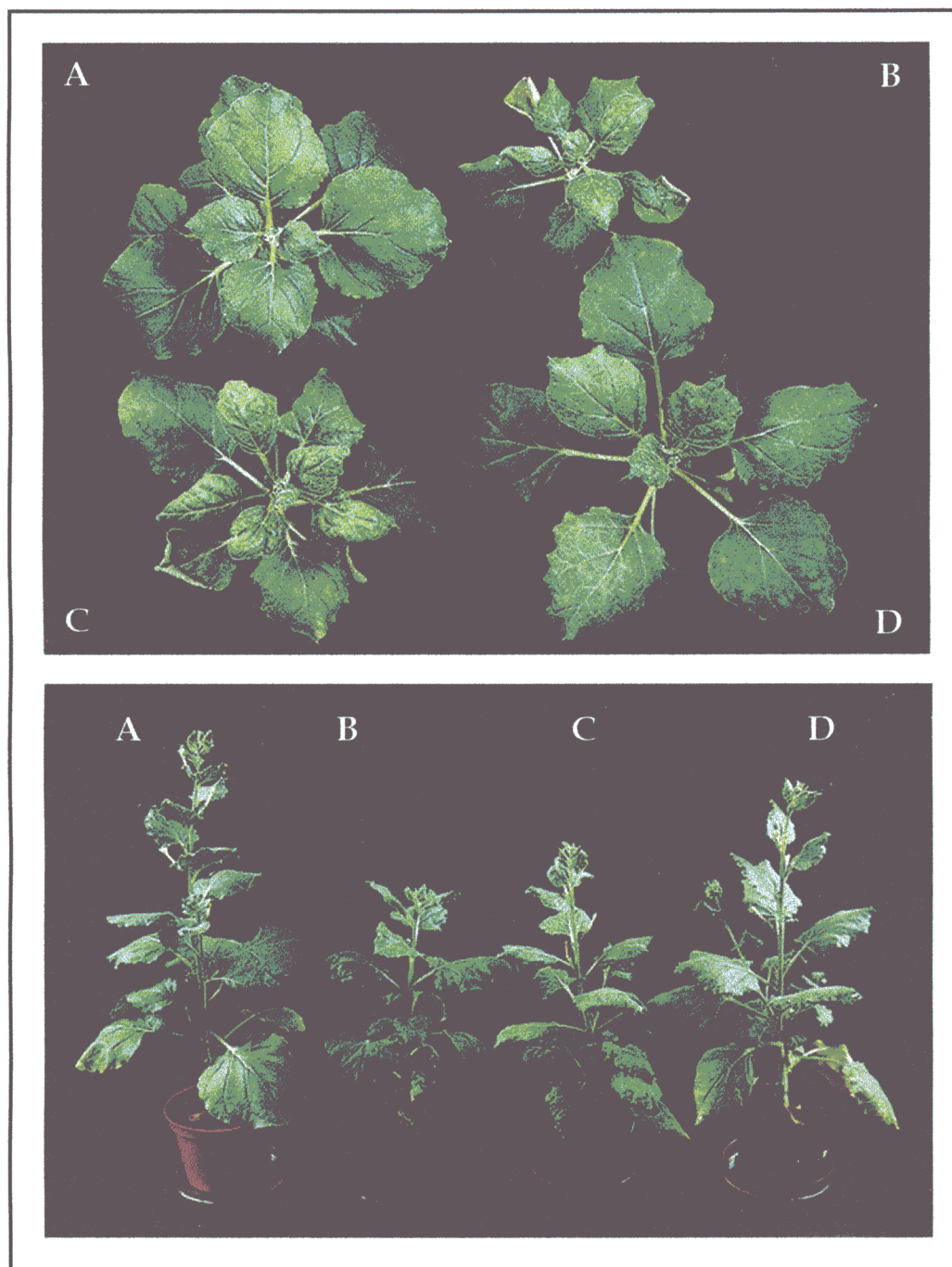


Figura 30. Plantas de *N. benthamiana* mostrando síntomas tras 16 días (fotografía superior) y 32 días (fotografía inferior) de la inoculación con las construcciones químéricas. A: planta sana, B: inoculación control con pIC, C: inoculación con pQ-0AT, D: inoculación con pQ-0NAT.

El clon pIC inoculado en plantas de *N. benthamiana* produjo síntomas claros a los 6 ó 7 días de la inoculación con curvamiento de las hojas nuevas y amarilleo de nervaduras que derivaban en deformaciones suaves de las hojas y aparición de manchas oscuras con ampollamiento (figura 30). En inoculaciones con pQ-0AT los primeros síntomas en *N. benthamiana* también aparecieron 6 ó 7 días de la inoculación. Las hojas más jóvenes mostraron fuerte curvamiento, llegando en ocasiones a enrollarse, de modo similar a lo que ocurre en plantas infectadas con PVY; los nervios presentaron notable aclareamiento, acompañado de aparición de mosaico en hoja (figura 30). Posteriormente estos síntomas se suavizaron, presentando hojas ligeramente curvadas y con mosaico. En la inoculación con pQ-0NAT la aparición de los síntomas no ocurrió hasta 10 ó 12 días de la inoculación. Las plantas presentaron mosaico suave y aclareamiento de nervios (figura 30).

En plantas de *N. clevelandii* el control pIC produjo puntos cloróticos en hoja inoculada y sistémica que también aparecieron, aunque de modo más atenuado, en las plantas inoculadas con pQ-0AT (figura 31). En esta ocasión los síntomas fueron muy diferentes a los producidos en esta planta por PVY, describir. En inoculaciones con pQ-0NAT no apareció infección sistémica en estas plantas. En *N. tabacum* var Xanthi no se produjo infección de ninguna de las quimeras ni de pIC.

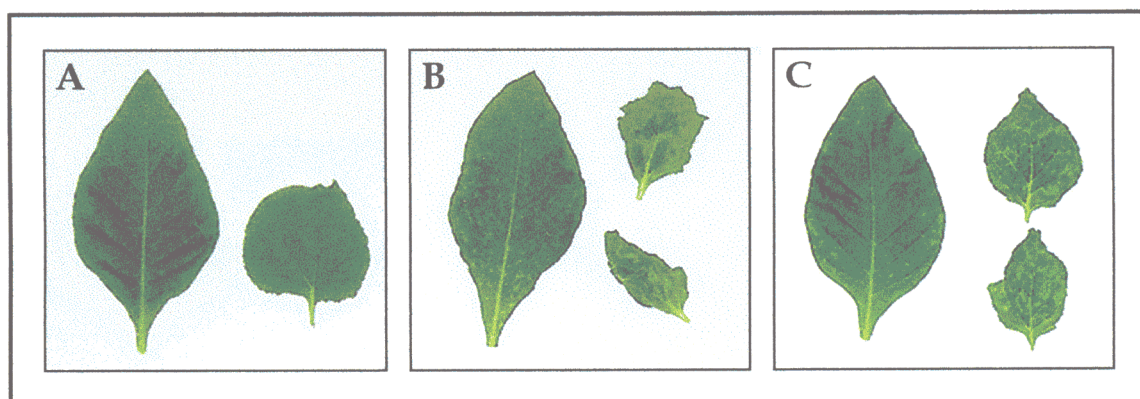


Figura 31. Síntomas en hoja de *N. clevelandii* (hoja izquierda de cada fotografía) y *N. benthamiana* (hoja/s derecha de cada fotografía) días después de la inoculación con pIC y pQ-0AT. A: plantas sanas, B: plantas inoculadas con el control pIC, C: plantas inoculadas con pQ-0AT.

Los síntomas producidos por la construcción pQ-0AT en plantas de *N. benthamiana* y *N. clevelandii* no son, por tanto, similares a los observados en infecciones con PVY y que se muestran en la figura 32.

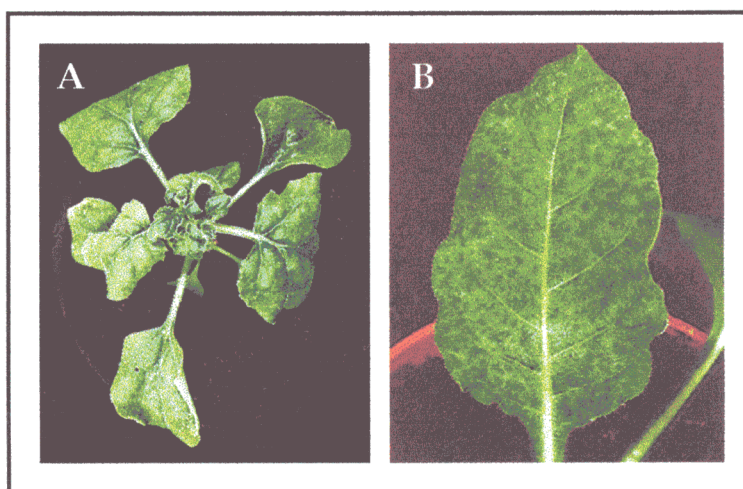


Figura 32. Síntomas de infección de PVY en planta. A.: infección en *N. benthamiana*, B: infección en *N. clevelandii*.

La naturaleza quimérica de las construcciones se analizó por medio del procedimiento de IC-RT-PCR con los cebadores HC9 y HC PVY como se describe en el apartado De materiales y métodos. Se obtuvieron fragmentos amplificados de 1.075 nucleótidos, 79 de los cuales pertenecían al gen P3 de PPV y los 996 restantes al HC quimérico de PVY (figura 33).

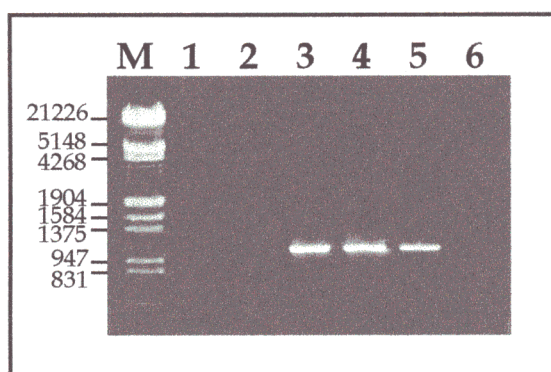


Figura 33. Amplificación por IC-RT-PCR de la región codificadora del HC de las construcciones quiméricas comprendida entre los cebadores HC 9 y HC PVY. Línea ;M: marcadores de peso molecular, línea 1: *N. benthamiana* sana, línea 2: *N. benthamiana* inoculada con el clon pIC, línea 3: *N. benthamiana* inoculada con el clon pQ-0AT, línea 4: *N. clevelandii* inoculada con pQ-0AT, línea 5: *N. benthamiana* inoculada con pQ-0NAT, línea 6: reacción control de PCR sin extracto de planta.

En las plantas en que se confirmó la naturaleza quimérica de los virus se secuenció la región correspondiente al HC a partir de fragmentos de 1.525 nucleótidos amplificados por IC-RT-PCR con los cebadores HC2 y HC9.

El análisis por Western blot empleando anticuerpos monoclonales que reconocen el HC de PVY reveló una banda de peso molecular aproximado de 50 kDa tanto en plantas de *N. benthamiana* como *N. clevelandii* infectadas con las construcciones quiméricas (figura 34A). Esta banda coincidía con la encontrada en muestras de planta infectada con PVY. Las plantas fueron analizadas igualmente empleando un suero policlonal que reconoce el HC de PPV (ver apartado 9 de esta sección), identificándose una banda correspondiente a esta proteína únicamente en las plantas control inoculadas con PPV 5.15 (figura 34B).

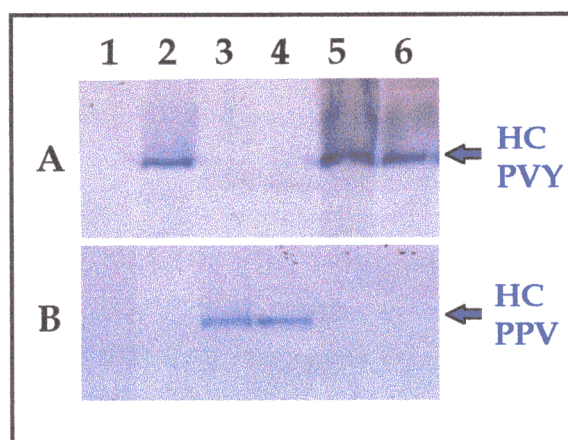


Figura 34. Análisis Western blot de plantas inoculadas con las construcciones quiméricas. A) Las membranas se incubaron con anticuerpos monoclonales para HC de PVY. B) Incubación con anticuerpos policlonaes para HC de PPV. Línea 1:planta sana, línea 2: planta control inoculada con PVY 0 AT, línea 3: planta inoculada con PPV 5.15, línea 4: planta inoculada con pIC, línea 5: planta inoculada con pQ-0AT, línea 6: planta inoculada con pQ-0NAT.

11. Transmisión por pulgones de las construcciones quiméricas.

Plantas de *N. benthamiana* infectadas con virus quiméricos así como con el clon pIC, se emplearon en ensayos de transmisión planta a planta por pulgones. Como control del proceso se llevaron a cabo transmisiones del aislado PPV 5.15. Los resultados obtenidos figuran en la tabla 14.

Tabla 14. Transmisiones por pulgones planta a planta a partir de plantas de *N. benthamiana* infectadas con las construcciones quiméricas pQ-0AT y pQ-0NAT.

VIRUS	NÚMERO DE ENSAYO									TOTAL	%
	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
5.15	7/15 ^a	9/16	0/14	11/1	6/15	5/15	7/15	3/10	2/15	50/129	38,75
				4							
pIC	0/15	1/16	3/15	0/15	0/15	0/15	0/15	1/14	0/15	5/135	3,7
pQ-0AT	0/15	0/16	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/14	0/15	0/135	-
pQ-0NAT	-	0/16	0/15	-	0/15	-	-	0/13	0/15	0/74	-

^a Número de plantas infectadas sobre el total de plantas empleadas en el ensayo.

La baja infectividad de la construcción pQ-0NAT condicionó el número de ensayos de transmisión por pulgón. Ninguna de las dos construcciones quiméricas resultó transmisible por pulgones. La transmisión a partir de plantas infectadas con el clon pIC fue baja (3,7%) en comparación con la obtenida para el aislado PPV 5.15 (38,75%).

DISCUSIÓN

El aislado PPV 3.3 procedente de albaricoquero se ha caracterizado como no transmisible por pulgones en experimentos de transmisión planta a planta. La ausencia de transmisión podría ser debida a las sucesivas inoculaciones mecánicas que este aislado sufrió desde su recolección, incluyendo su cambio de huésped leñoso a planta herbácea, y en las cuales pudieron surgir mutaciones deletéreas para la transmisión que quedasen incorporadas en el genoma viral (Sako, 1980; Lecoq *et al.*, 1991; Legavre *et al.*, 1996). Esta hipótesis parece coincidir con el hecho de que PPV 3.3 presente una CP alterada con una delección de quince residuos aminoacídicos en su extremo carboxilo terminal. Esta delección afecta, además, a un motivo DAGX cuya implicación en el proceso de transmisión por pulgones parece evidente. El virus PPV R3-NAT resulta, al igual que PPV 3.3, no transmisible por pulgones en experimentos de transmisión planta a planta. PPV R3-NAT es un aislado creado en laboratorio a partir del virus transmisible PPV R3 y se diferencia de éste únicamente en la delección que R3-NAT presenta en su CP y que reproduce la encontrada en PPV 3.3. Resultaría inmediato, por tanto, atribuir a dicha alteración la pérdida de transmisibilidad de PPV R3-NAT.

Los viriones purificados de PPV 3.3 y PPV R3-NAT se transmitieron, sin embargo, en experimentos a través de membranas cuando los pulgones adquirían las partículas virales junto con HC del aislado transmisible PVY 0AT. Este resultado indicaba que la CP de ambos aislados puede ser funcional en transmisión a pesar de la delección. Esto sugería que la causa de la falta de transmisión de PPV 3.3 podría estar en su HC, cuya secuencia se desconocía. En el caso de PPV R3-NAT el HC no parecería ser el responsable de la falta de transmisión por pulgones, ya que su secuencia es idéntica a la de PPV R3, que sí es capaz de transmitirse.

El comportamiento de PPV 3.3 y PPV R3-NAT en transmisión podría ser explicado atendiendo a diferentes fenómenos. En el caso de PPV 3.3 no se conocía la secuencia codificadora del HC, lo cual hizo pensar en un principio en la existencia de alguna mutación en esta proteína que determinara su pérdida de funcionalidad en transmisión. Por otra parte, el hecho de que tanto PPV 3.3 como PPV R3-NAT sean transmitidos cuando los pulgones adquieren viriones purificados junto con un HC funcional en transmisión y no así en ensayos de transmisión planta a planta podría deberse a una concentración mayor de principios activos en la solución de alimentación que en las plantas infectadas (Flasinski y Cassidy, 1998). La probabilidad de que viriones y HC se encuentren e interaccionen entre sí es mucho mayor en sistemas *in vitro*, lo cual deriva en una transmisión más eficiente. Además, en transmisiones planta a planta puede que exista algún componente del huésped capaz de interaccionar con las proteínas virales implicadas en el proceso de transmisión, dificultando dicho proceso (López-Moya *et al.*, 1999).



Otra explicación al comportamiento de PPV 3.3 y PPV R3-NAT, diferente en transmisiones planta a planta y por sistemas artificiales de membranas, se centra en el HC de origen heterólogo que interviene en los ensayos con membranas. Puede que el HC de PVY sea capaz de unirse a la CP alterada de PPV con una mayor eficacia que el HC propio de PPV, bien reconociendo el motivo DAG alterado o bien uniéndose a un motivo de la CP diferente al identificado por el HC de PPV.

Las transmisiones heterólogas de potyvirus por pulgones, en las cuales el HC producido por diferentes potyvirus es capaz de promover la transmisión de otros miembros del grupo, han sido descritas en ocasiones anteriores (Govier y Kassanis, 1974; Pirone, 1981; Sako y Ogata, 1981; Lecoq y Pitrat, 1985; López-Moya *et al.*, 1995; Blanc *et al.*, 1997). Incluso una de las bases del conocimiento del HC fue la transmisibilidad del potexvirus del mosaico aucuba de la patata (PAMV) por pulgones que previamente se habían alimentado de extractos de plantas infectadas con PVY (Kassanis y Govier, 1971). En este tipo de transmisiones existe cierto grado de especificidad en la interacción virus-HC (citadas), resultando transmisibles solamente determinadas combinaciones. Un ejemplo de esta especificidad aparece en ensayos de transmisión con el virus del mosaico amarillo del calabacín (ZYMV), y los virus 1 y 2 del mosaico de la sandía (WMV 1 y WMV 2) (Lecoq y Pitrat, 1985) en los que los HC de los virus WMV 1 y WMV 2 promovían la transmisión de ambos aislados, mientras que únicamente el HC de WMV 2 era capaz de transmitir ZYMV, cuyo HC, a su vez, resultaba funcional en la transmisión de WMV 2. De modo sorprendente, en ensayos de transmisión en los que se combinaron los virus ZYMV y WMV 2 se vio favorecida la transmisión de ZYMV al emplear en el proceso un HC de WMV 2, viéndose favorecida la transmisión heteróloga sobre la homóloga. Algo similar ocurriría en el caso de PPV 3.3, donde la transmisión heteróloga con HC de PVY parece preferible a la transmisión homóloga con HC de PPV.

En el caso de la transmisión heteróloga de PPV con HC de PVY ha resultado evidente que la interacción virus-HC cumple las condiciones de especificidad requeridas para que la transmisión tenga lugar. El hecho de que el aislado PPV 3.3 no transmisible en experimentos de transmisión planta a planta en los que interviene su propio HC, sí lo sea en ensayos con HC heterólogo de PVY podría deberse a que la modificación de la CP de PPV 3.3 no sea un obstáculo para su unión al HC de PVY pero sí para la unión de su propio HC, favoreciéndose de este modo la transmisión heteróloga. Resultaría de interés la obtención de un HC purificado de PPV funcional en transmisión que permitiera llevar a cabo ensayos de transmisión por membranas artificiales tanto de PPV 3.3 como 5.15 ya que, como dijimos anteriormente, las condiciones de transmisión en experimentos de planta a planta y a través de membrana no resultan comparables.

La unión del HC de PVY a la CP de PPV podría tener lugar a través de algún otro motivo de la CP de PPV diferente al DAG que no se vea alterado por la delección presente en los aislados no transmisibles. Resulta llamativo el hecho de que el HC de PVY sea capaz no solo de transmitir PPV 3.3 y R3-NAT sino que además lo haga con una eficacia mayor a la que muestra en experimentos de transmisión por membrana para PPV 5.15 (tabla 4). Podría ocurrir que la delección de quince aminoácidos en el extremo amino terminal de la CP de PPV influya sobre la conformación espacial de dicha proteína, favoreciendo el acceso al punto de unión al HC de PVY.

Son diversos los trabajos que apoyan una hipótesis de interacción entre el HC y la CP de potyvirus en la cual se vería involucrada la secuencia DAGX localizada en el extremo amino terminal de la CP (Atreya *et al.*, 1990; Atreya *et al.*, 1991; Gal-On *et al.*, 1992; Harrison y Robinson, 1988; Blanc *et al.*, 1997; López-Moya *et al.*, 1999) y un motivo PTK en la secuencia del HC (Peng *et al.*, 1998). Baulcome *et al.*, 1993, demostraron que el virus X de la patata (PVX), un potexvirus no transmisible por pulgones, resultaba transmitido cuando se le sustituían los aminoácidos de la región amino terminal de la CP por los correspondientes del potexvirus del mosaico aucuba de la patata (PAMV) que contenían el motivo DAG. Esto haría pensar que la aparición en una posición accesible de la CP de una secuencia corta que contenga un motivo adecuado para la interacción con el HC podría ser suficiente para permitir la transmisión por pulgones. Sin embargo hay trabajos que ponen de manifiesto que no solo es importante el motivo DAGX sino también el contexto en que se encuentra, de modo que la mutación de aminoácidos del entorno de la secuencia DAG tiene como consecuencia en numerosas ocasiones la pérdida de transmisibilidad viral (Atreya *et al.*, 1991 y 1995; López-Moya *et al.*, 1999). El hecho de que el motivo DAL de la CP de PPV 3.3 no impida la transmisión del virus mediada por un HC de PVY y que sin embargo al crear este mismo triplete en el genoma de TVMV éste pierda la capacidad de transmitirse planta a planta además de ver reducida drásticamente su transmisión en sistemas de membranas (López-Moya *et al.*, 1999), podría ser un reflejo de la importancia del contexto en que se encuentra el triplete para la transmisión. Esta secuencia DAL impide la unión de la CP y el HC homólogo en ensayos de interacción en membrana de nitrocelulosa (Blanc *et al.*, 1997).

La unión del HC de PVY a la CP de PPV 3.3 y R3-NAT podría haberse visto favorecida por el nuevo entorno que rodea a este motivo, diferente del de PPV 5.15. Esta hipótesis no podrá verse analizada hasta que se obtenga un modelo de la estructura tridimensional de la CP de potyvirus que nos permita analizar el efecto de las distintas mutaciones sobre la conformación de la proteína y, por consiguiente,

de la accesibilidad de los motivos de la CP implicados en la transmisión y su efecto sobre la interacción virus-HC.

La hipótesis de una interacción del HC de PVY con un motivo de la CP de PPV 3.3 y R3-NAT diferente al DAG se basa en la aparición de un segundo motivo DAG, o similar, en la secuencia de la CP de diversos potyvirus (López-Moya *et al.*, 1999). Este segundo motivo se separa del primer DAG por un número variable de aminoácidos y aparece precedido de ciertos residuos conservados (figura 33). Trabajos con TVMV analizan el efecto de mutaciones en los motivos DAG y NTG que este virus presenta en su CP (López-Moya *et al.*, 1999). Cuando el segundo triplete, NTG, se transforma por mutaciones en un motivo DAG la transmisión del virus planta a planta se ve reducida. Este segundo DAG no es capaz, además, de promover la transmisión de TVMV con secuencias DAL o DAS en su primer triplete (López-Moya *et al.*, 1999).

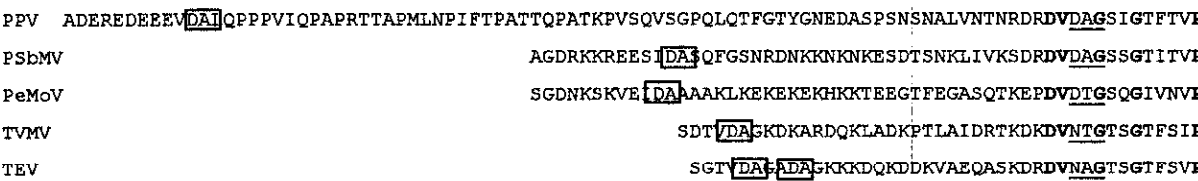


Figura 33. Comparación de aminoácidos de la región amino terminal de la CP de diferentes potyvirus (López-Moya *et al.*, 1999). Se han alineado las secuencias de PPV 3.3, PSbMV (Johansen *et al.*, 1991), PeMoV (Teychenet y Dietzgen, 1994), TVMV (Domier *et al.*, 1986) y TEV (Allison *et al.*, 1986) atendiendo al inicio del core de la CP resistente a la digestión con tripsina (Shukla y Ward, 1989). Los residuos señalados en negrilla están altamente conservados entre potyvirus. Los motivos supuestamente involucrados en transmisión por pulgones aparecen en un recuadro. La posición de los motivos adicionales DAG, o similares, se subrayan.

Los estudios sobre la funcionalidad del segundo motivo DAG en TVMV no son suficientes para llegar a ninguna conclusión al respecto. En mutantes de TVMV con un primer motivo DAG alterado no ocurría la transmisión por pulgones, por lo que parece que el segundo motivo, que en este caso es NTG, no es funcional en

transmisión y las mutaciones en el primer DAG no son suficientes para que el NTG adquiriera dicha funcionalidad.

En PPV 3.3 y R3-NAT la delección de quince aminoácidos podría alterar la CP, determinando un cambio conformacional que facilitaría el acceso al segundo DAG. Por otra parte, también podría ocurrir que el segundo DAG de todos los PPV sea reconocido por el HC de PVY y que la delección, en contra de impedir dicho reconocimiento, lo favorezca.

Hay que señalar en este punto el hecho de que en nuestro laboratorio se están realizando en la actualidad ensayos de unión *in vitro* entre HC y CP virales. Los resultados de que disponemos son todavía preliminares, pero parecen indicar una interacción positiva del HC de PPV 3.3 y de PPV 5.15 con las CPs de ambos aislados. De confirmarse, estos resultados podrían hacernos descartar la falta de unión entre el HC y la CP de PPV 3.3 como causa de la no transmisión de este aislado por pulgones. No podemos olvidar, sin embargo, que la existencia de tal interacción en condiciones artificiales no asegura la ocurrencia del mismo fenómeno en condiciones naturales. Como mencionamos anteriormente, resultaría esencial conocer el comportamiento del HC purificado de PPV 3.3 y 5.15 en ensayos de transmisión de virus con sistemas de membranas.

Las secuencias del HC de PPV 3.3 no se conocía hasta el momento. El análisis de secuencias de un total de nueve clones que contenían el producto de amplificación por PCR de esta región ha puesto de manifiesto una alta tasa de cambios nucleotídicos en los diferentes clones con respecto a una secuencia consenso. El elevado número de mutaciones encontrado en estos clones (24 mutaciones en 9 clones) no es, sin embargo, un fenómeno exclusivo de este aislado, ya que en cinco clones que contenían el HC de PPV 5.15 aparecieron 21 cambios nucleotídicos. La aparición de estas mutaciones puede ser explicada atendiendo a dos causas diferentes, como son mutaciones producidas durante el proceso de clonaje de las regiones codificadoras del HC o bien a una población viral heterogénea.

La obtención de fragmentos amplificados de una región del ARN viral implica un primer paso en el que se sintetiza una cadena de ADN complementaria al ARN viral por medio de una enzima transcriptasa reversa, seguido de un proceso de amplificación del ADN por una enzima polimerasa. Las enzimas empleadas en ambos procesos han sido, respectivamente, la transcriptasa reversa del virus de la mieloblastosis de aves (AMV RT) y la enzima polimerasa obtenida de las bacterias termo-resistentes *Thermus aquaticus*. Ninguna de estas enzimas dispone de capacidad correctora 3'-5' que les permita eliminar los nucleótidos incorporados

erróneamente, aumentando así la tasa de errores que, además, se ve influenciada por multitud de parámetros ambientales como pueden ser la concentración de nucleósidos trifosfato, el contexto de la secuencia del nucleótido copiado o el ambiente iónico. Así, la tasa de error descrita para la enzima *Taq* oscila entre 2×10^{-5} y $2,1 \times 10^{-4}$ sustituciones por nucleótido y ronda de replicación (Tindall y Kunkel, 1988; Keohavong y Thilly, 1989; Cariello *et al.*, 1991; Ling *et al.*, 1991; Lundberg *et al.*, 1991; Barnes, 1992). En el caso de AMV RT los trabajos existentes parecen atribuirle una tasa de error próxima a $1,6 \times 10^{-5}$ (Williams y Loeb, 1992) o bien simplemente por debajo de 2×10^{-4} (Sooknanan *et al.*, 1994). Si consideramos únicamente la tasa de mutaciones de la enzima *Taq* polimerasa, tendríamos que en los clones que contienen los fragmentos amplificados del HC de los aislados PPV 3.3 y 5.15 (de tamaño próximo a 1.400 nucleótidos y obtenidos tras 30 ciclos de amplificación), podrían aparecer entre 0,8 y 8,8 mutaciones en cada clon.

El análisis del tipo de cambios nucleotídicos encontrados en estos clones ha puesto de manifiesto una alta frecuencia de transiciones del nucleótido Adenina a Guanina (A G), que en el HC de PPV 3.3 supone un 45,83 % de los cambios y un 47,61 % en PPV 5.15, seguida por la transición de Timina a Citosina (T C) que supone el 29,16 % de las sustituciones en HC de PPV 3.3 y el 33,33% en PPV 5.15. Otros cambios encontrados en menor porcentaje son Guanina por Adenina (G A), Citosina por Adenina (C A), Timina por Adenina (T A) y Citosina por Timina (C T). Los trabajos sobre la enzima *Taq* no sólo han estudiado la tasa de error de esta polimerasa sino también el tipo de sustituciones que genera y que son transiciones del tipo AT-GC y TA-CG (Tindall y Kunkel, 1988; Saiki *et al.*, 1988; Keohavong y Thilly, 1989; Eckert y Kunkel 1990).

En resumen, tanto el número de mutaciones que aparece en los distintos clones como el tipo de cambios nucleotídicos resultantes parecerían indicar que dichas sustituciones son debidas a errores del proceso de amplificación y clonaje de las regiones codificadoras del HC. Pensamos, sin embargo, que si bien un determinado número de dichas mutaciones ha podido ser generado por las enzimas AMV RT y *Taq* polimerasa, debe existir un porcentaje de cambios atribuible a una heterogeneidad poblacional.

En primer lugar, se han encontrado idénticas mutaciones nucleotídicas en diferentes clones, tanto de PPV 3.3 como 5.15. En los 14 clones secuenciados que contienen el HC de PPV aparecen un total de 28 posiciones mutadas, 6 de las cuales coincidieron en clones diferentes (C₁₄₆₆A, A₁₆₃₁G, T₁₇₃₆C, T₁₇₅₇C, A₁₈₈₄G, A₂₄₃₂G) (figura 14). Estos cambios no pueden ser atribuidos a errores en el proceso de amplificación y constituyen un apoyo a la hipótesis de que al menos algunas de las

mutaciones que aparecen en los clones secuenciados son un reflejo de la variabilidad poblacional.

En segundo lugar, los clones pHFHC3.3 y pHFHC5.15 contienen, respectivamente, 1 y 8 cambios nucleotídicos que se traducen en 1 y 3 cambios de aminoácidos. Las reacciones de transcripción reversa y amplificación por PCR tuvieron lugar en idénticas condiciones para el HC de ambos aislados. La enzima polimerasa empleada, denominada High Fidelity, se compone por una mezcla de polimerasas *Taq* y *Pwo* (*Pyrococcus woesei*), la última de las cuales posee capacidad correctora de errores exonucleasa 3'-5'. En estas condiciones la tasa de error atribuida al proceso de amplificación se vería reducida a $8,5 \times 10^{-6}$ (Boehringer-Mannheim), esperando del orden de 0,35 mutaciones para los fragmentos amplificados. Aún teniendo en cuenta los posibles errores añadidos en la transcripción reversa, el alto número de mutaciones que aparecen en el clon pHF HC 5.15 no podría ser atribuido a fallos de las enzimas.

Por otra parte, los datos obtenidos de los "re-clonajes" llevados a cabo a partir de las secuencias de HC contenidas en los plásmidos p1HC3.3, p1HC5.15 y p3HC5.15 parecen confirmar la existencia de mutaciones originadas durante la transcripción reversa y/o amplificación por PCR, pero en ningún caso en un número tan elevado como el observado en los clones originales. El número de mutaciones de estos clones varió entre cero y uno, incluso en el caso de los obtenidos a partir de p3HC5.15, que incluían un paso de transcripción reversa.

Las secuencias de la CP de los clones de PPV 3.3 y PPV 5.15 se diferencian entre sí en los nucleótidos que aparecen en posiciones 8727, 8921 y 8945 (figura 19). Estas diferencias no se deberían a mutaciones ocurridas durante el proceso de clonaje sino que serían un reflejo de diferencias en el genoma de ambos aislados de PPV, y por consiguiente no se han considerado como mutaciones poblacionales ni de PCR. Sería recomendable, no obstante, el análisis de un número mayor de clones que permitiese comprobar que tales diferencias se mantienen en un porcentaje mayoritario de la población viral, ya que en el caso del HC tres de los clones del aislado 5.15 también comparten cuatro cambios nucleotídicos que podrían haberse atribuido a una característica propia del aislado de no ser porque han aparecido en el clon p1HC3.3 y por su ausencia en los clones p1HC5.15 y p2HC5.15. Teniendo todo esto en cuenta, en los clones que contienen la secuencia de la CP de los dos aislados de PPV el número de mutaciones nucleotídicas sería menor al encontrado en el caso de los clones del HC. Se ha descrito en varios trabajos cómo en ocasiones ciertas regiones de los genomas de diferentes organismos presentan una mayor propensión a sufrir mutaciones durante los procesos de replicación. La región del

HC de PPV podría soportar una mayor variabilidad en su secuencia siempre y cuando dichos cambios no afectasen a la funcionalidad de la proteína.

Es frecuente en virus de ARN, tanto de animales como de plantas, que un genoma viral, entendido como un colectivo replicante, no tenga una estructura fija sino que en realidad esté compuesto por moléculas genómicas que difieren entre sí en uno o más nucleótidos. A nivel poblacional, un genoma viral puede definirse mediante una secuencia consenso, pero en realidad está compuesto por un espectro de mutantes. A estas distribuciones de mutantes se les denomina cuasiespecies virales (Eigen, 1993; Domingo, 1994; Duarte *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1997). La secuencia consenso se definiría como aquella que en cada posición tiene el nucleótido (o aminoácido) más abundante en la población (Domingo, 1994; Duarte *et al.*, 1994). La secuencia más abundante encontrada en una población, que en ocasiones coincide con la secuencia consenso, se denomina secuencia maestra.

Los aislados de PPV, en vista de los datos resultantes de los clonajes de la región codificadora del HC, podrían ajustarse a un modelo de cuasiespecie. Las mutaciones se generarían por la ausencia o baja actividad de las funciones de corrección y reparación de ácidos nucleicos de las replicasas virales. Esas mutaciones podrán mantenerse en la población siempre y cuando no tengan un efecto negativo para la eficacia biológica del genoma mutante. De este modo se acumularán genomas portadores de diversas y diferentes mutaciones, dentro siempre de un margen impuesto por la necesidad de mantener sin alterar la información genética. Esto es lo que ocurre, por ejemplo, con el VIH-1 que impresionó por la extrema diversidad genética en cada individuo infectado, probablemente propiciada por largos períodos de replicación viral desde el momento de la infección hasta que se dan síntomas y se procede al aislamiento de virus (Domingo, 1994). Las mutaciones acumuladas en la población viral pueden verse sometidas a selección mediante los llamados "cuellos de botella", como sería el hecho de que ocurra una transmisión viral de unos individuos a otros. Así, en el caso de PPV la transmisión planta a planta mediada por pulgones seleccionaría un cierto número de secuencias que pasarían a ser las fundadoras de una población en la nueva planta.

Teniendo en cuenta estos conceptos podríamos pensar que la delección de quince aminoácidos del extremo amino terminal de la CP de PPV 3.3 pudo originarse por una mutación durante la replicación del virus en la planta. Esta mutación solamente permanecería en caso suponer alguna ventaja para el virus, o al menos siempre y cuando fuera neutral. En las muestras de campo de albaricoqueros infectados con PPV 3.3 pudo comprobarse que la CP no presentaba ningún tipo de delección, lo cual es lógico teniendo en cuenta que dicha mutación implica la pérdida

de transmisión del virus por pulgones, que es el principal sistema por el que el virus se perpetúa a lo largo del tiempo en la naturaleza. Solamente cuando el virus fue inoculado mecánicamente en plantas de *N. benthamiana* y mantenido en las mismas por sucesivos pases también mecánicos pudo hacerse ventajoso para el virus el ser portador de un genoma con una delección que únicamente parece impedir su transmisión por pulgones. De modo sorprendente, la delección encontrada en la CP de PPV 3.3 es idéntica a la encontrada en otro aislado de PPV de origen alemán (Maiss *et al.*, 1989), lo cual indica que esta delección debe conferir al virus algún tipo de ventaja.

En resumen, con los datos de secuencias de que disponemos podemos decir que las regiones codificadoras del HC de PPV 3.3 y PPV 5.15 presentan mutaciones debidas, en parte, a errores de las polimerasas durante el proceso de clonaje pero que en un porcentaje determinado reflejan una variabilidad poblacional de secuencias. De cualquier modo, teniendo en cuenta los datos obtenidos a partir de la secuenciación directa de productos de amplificación por PCR, no parece que exista ninguna diferencia significativa entre el HC de los dos aislados de PPV. Por otra parte, las mutaciones encontradas en la secuencia codificadora del HC de PPV 3.3 no afectan en ningún caso a los motivos o residuos independientes que hasta ahora se conoce están implicados en el proceso de transmisión del virus por pulgones (figura 18 de resultados). Por lo tanto, la no transmisibilidad del aislado PPV 3.3 no parece ser debida a alteraciones en el HC.

La sustitución de la región correspondiente al HC en los clones pR3, pNAT y pIC por la homóloga de p1HC3.3 y p1HC5.15 nos ha permitido analizar el efecto que sobre la actividad biológica del virus pueden tener ciertas mutaciones del HC. Las primeras construcciones realizadas (pR3/3.3, pR3/5.15, pNAT/3.3 pNAT/5.15) presentaban el genoma de PPV bajo un promotor transcripcional T7, por lo cual los ensayos de infectividad de dichas construcciones conllevaban el inconveniente de tener que ser realizados a partir de transcritos de ARN de los genomas virales. El problema añadido del difícil manejo de los clones pR3 y pNAT condicionó la aparición de una construcción pR3/5.15 no infectiva por alteraciones ajenas a la secuencia del HC 5.15, hecho comprobado por medio de las denominadas construcciones de "marcha atrás". Obviando este artefacto, la secuencia del HC de PPV 5.15 resultó ser funcional en todas las construcciones en que se insertó, mientras que el HC de PPV 3.3 determinó la no infectividad de los clones pR3/3.3, pNAT/3.3, pIC- R3/3.3 y pIC- NAT/3.3. Resulta evidente, por tanto, que alguna o más de una de las mutaciones que aparecen en la secuencia del HC del clon p1HC3.3 (L₄₄₂H, I₅₈₀V, G₆₅₀S) interfiere con alguna o más de una de las funciones que hasta ahora se han atribuido al HC. En este sentido, mutaciones generadas en la región central del HC de TVMV (Klein *et al.*, 1994) y de TEV (Kasschau *et al.*, 1997)

afectan tanto a la acumulación como al movimiento a larga distancia del virus en la planta. Podría ocurrir que alguna de las mutaciones que aparecen en p1HC3.3 tuvieran el mismo efecto.

Otra de las funciones desempeñada por el HC de los potyvirus es su autoprocesamiento por el extremo carboxilo para separarse así de la poliproteína viral (Carrington *et al.*, 1989). Se ha comprobado que la Cys en posición 649 del HC de TEV resulta esencial para que el procesamiento tenga lugar, perteneciendo este residuo a una secuencia Gly-Tyr-Cys-Tyr (GYCY) altamente conservada en potyvirus (Seok y Carrington, 1989). En el clon p1HC3.3 esta secuencia está alterada, apareciendo un residuo de Ser en la posición correspondiente a la Gly (figura 15 de resultados), determinando un motivo Ser-Tyr-Cys-Tyr (SYCY). En realidad la sustitución del aminoácido Gly por Ser es un cambio conservado ya que ambos residuos son hidrofóbicos y sin carga, si bien el tamaño de la Gly es menor al de la Ser. Se haría necesario un estudio del efecto que esta mutación aislada puede tener sobre la actividad biológica de PPV. Según esto, si bien parece probable que la falta de infectividad de las construcciones que contienen la secuencia del HC de PPV 3.3 se deba a la alteración de la actividad autoproteolítica de dicho HC, no podemos descartar la posibilidad de que alguna de las restantes mutaciones de 1HC3.3 (L₄₄₂H, I₅₈₀V) sea la responsable del comportamiento de estas construcciones.

Secuencias con mutaciones del tipo de p1HC3.3 pueden aparecer en una población viral como resultado de un mecanismo que busca la variación de los virus y que se vale de las mutaciones puntuales generadas durante la replicación genómica (Domingo, 1994). La capacidad de variación tiene un límite impuesto por la información genética que se debe mantener, de modo que cuanto mayor es la complejidad de la información, mayor es también la fidelidad necesaria para la copia del mensaje. Una estructura en cuasiespecies, con una secuencia maestra y el espectro de mutantes, se perdería cuando la fidelidad de copia descendiese por debajo de un valor umbral crítico (Domingo, 1994). En el caso de PPV 3.3 pueden haberse originado mutaciones puntuales que resulten deletéreas para su portador, pero que sean capaces de integrarse en la población viral siempre y cuando la mayor parte de los genomas virales contengan su información sin alterar. Por otra parte, no podemos olvidar el hecho de la aparición de mutaciones puntuales en los clones que contienen la secuencia codificadora del HC de PPV debidas a errores durante el proceso de clonaje, que explicarían la detección de mutaciones perjudiciales para el virus simplemente como artefactos.

Los ensayos de transmisión por pulgones planta a planta realizados a partir de *N. benthamiana* inoculadas con las construcciones pNAT/5.15, pIC-R3/5.15 y pIC-NAT/5.15 pusieron de manifiesto la no transmisibilidad del "aislado"

pNAT/5.15. Este comportamiento coincide con el mostrado por pNAT, compartiendo ambas construcciones la característica de contener una delección en la secuencia codificadora para la CP. En el caso de los ensayos de transmisión con las construcciones pIC-R3/5.15 y pIC-NAT/5.15 resultó sorprendente el aumento del porcentaje de transmisión con respecto al clon pIC, siendo respectivamente de más del 42% frente al 3,44% de pIC (tabla 11). Hay que recordar que en este caso la construcción denominada pIC-NAT/5.15 no contiene ninguna delección que afecte a la CP y que su nombre sólo hace referencia a la construcción a partir de la que se obtuvo su HC (pNAT/5.15). Por lo tanto, pIC-R3/5.15 Y pIC-NAT/5.15 realmente son iguales, y se diferencian del clon pIC únicamente por contener la región codificadora del HC del aislado PPV 5.15 en vez de la del aislado PPV Rankovik original del clon pIC. La comparación de la secuencia aminoacídica entre el HC del aislado PPV Rankovik y 5.15 revela la existencia de dos únicas diferencias en las posiciones 551 y 702 (figura 25). En la posición 551 el HC del aislado Rankovik presenta un aminoácido Lys (K) mientras que en el HC de PPV 5.15 aparece una Arg (R), siendo ambos residuos hidrofílicos y de carga positiva. La posición 702 se ocupa por un residuo de Ile (I) en el HC de PPV Rankovik y por una Val (V) en el de PPV 5.15, siendo nuevamente ambos aminoácidos de características similares, hidrofóbicos y sin carga. Si bien los cambios son conservados en las dos posiciones sugerimos que alguna de estas diferencias, o ambas, podrían determinar el comportamiento diferente del HC de los dos aislados de PPV.

La forma activa del factor HC en transmisión parece ser un homodímero (Thornbury et al., 1985; Atreya et al., 1992) de modo que sería posible que ciertas alteraciones en la secuencia del HC afectasen indirectamente las interacciones iónicas entre los dos monómeros de la proteína, resultando en la pérdida total o parcial de dimerización y por extensión en la reducción de la actividad del HC (Atreya et al., 1992). En el caso de PPV 5.15 ocurriría que los aminoácidos en posición 551 y/o 702 serían más favorables para tal interacción que los presentes en idénticos lugares en el HC de PPV Rankovik (clon pIC). Puede ser que en el HC de PPV Rankovik la estructura terciaria se vea afectada por los residuos indicados, de modo que se enmascaren los motivos requeridos para la interacción del HC ya sea con el estilete del vector o con los monómeros de CP de la partícula viral, suceso este último que también podría estar relacionado con la forma dimérica de la proteína. De este modo, la transmisión podría llevarse a cabo, pero con muchos más impedimentos que en el caso de PPV 5.15.

La obtención de construcciones quiméricas de genoma completo de PPV con la secuencia del HC de los aislados PVY 0AT y PVY 0NAT ha puesto de manifiesto la funcionalidad de un HC en un contexto ajeno al propio permitiendo la infectividad en planta del virus quimérico. Esto quiere decir que el HC de PVY es

capaz de procesarse y además puede desempeñar las funciones habituales en las que parece encontrarse implicado, como son la replicación, movimiento a larga distancia, desarrollo de síntomas y, posiblemente, movimiento célula a célula. No parece capaz, sin embargo, de promover la transmisión por pulgones de los virus quiméricos.

El clon pIC sobre el que se realizó la construcción de pQ-0AT y pQ-0NAT posee un porcentaje de transmisión muy bajo, menor al 4%. Esto podría condicionar la transmisibilidad de nuestras construcciones, si bien el hecho de que cuando en pIC se sustituye la región HC por la correspondiente del aislado PPV 5.15 aumente notablemente la transmisión nos llevó a pensar que en el caso de las quimeras, en el que se está haciendo un intercambio similar, la transmisión también podría verse incrementada. El hecho de que el HC de PVY en un contexto ajeno al propio sea capaz de posibilitar la infectividad, pero no la transmisión del virus resulta llamativo. El HC de los aislados PVY-0AT y PVY-0NAT que aparece en las construcciones quiméricas presenta ligeras diferencias con respecto al HC de estos aislados en la naturaleza. Así, la secuencia inicial de aminoácidos en el HC PVY de las quimeras es Ser-Asp-Pro-Glu-Asn (SDPEN), mientras que la secuencia original del HC de los aislados PVY-0AT y PVY-0NAT es Ser-Asn-Ala-Glu-Asn (SNAEN). Los residuos D y N, que ocuparían la misma posición en el HC de las quimeras y en el de PVY respectivamente, se diferencian en la carga, negativa en D y neutra en N, siendo ambos hidrofílicos. En el caso de los residuos P y A ambos son hidrofóbicos y sin carga. El cambio de los residuos NA originales a DP en la quimera se realizó con el objetivo de asegurar el procesamiento en el extremo amino de la proteína HC llevado a cabo por la proteasa P1 y que corta entre el residuo Tyr (Y) terminal de la P1 y el de Ser (S) inicial del HC. Sin embargo, puede que esta sustitución posibilite la proteólisis en este punto pero que afecte a la función del HC de PVY en transmisión.

En cuanto a la infectividad y la aparición de síntomas, la construcción pQ-0AT mostró un comportamiento similar al del control pIC, detectándose síntomas en *N. benthamiana* inoculadas a los 6 ó 7 días de la inoculación. En un principio las plantas inoculadas con pQ-0AT presentaban ligero enrollamiento de las hojas similar al observado en *N. benthamiana* infectada con PVY. El hecho de que el HC de los potyvirus esté implicado en la determinación de síntomas en la planta infectada podría explicar cómo en las inoculaciones con esta construcción el HC de PVY influye en un primer momento en la manifestación de síntomas. Posteriormente ese primer enrollamiento se vio atenuado, observándose síntomas característicos de PPV, comparables a los generados por pIC. Esto indicaría que, si bien en un principio el HC de PVY es capaz de condicionar la aparición de síntomas característicos de este aislado aún encontrándose dicha secuencia en un contexto

ajeno a PVY, finalmente factores virales del genoma de PPV, distintos al HC, determinan síntomas propios de PPV.

La construcción p-Q0NAT mostró una infectividad menor, si bien hemos observado que dicha infectividad ha ido en aumento al aumentar también el número de pases de este "virus" de unas plantas a otras por inoculación mecánica. En principio, esto parece indicar que en este caso podría ocurrir que el HC de PVY-0NAT que contiene esta construcción, y que se diferencia del HC de PVY-0AT únicamente en el aminoácido en posición 334, mostrando un motivo NITC en lugar del conservado KITC. Esta sustitución podría influir no sólo en la capacidad de transmisión del virus por pulgones, sino también en una menor acumulación de virus en la planta que retrasara la aparición de síntomas.

CONCLUSIONS

1. La delección que presenta el aislado PPV 3.3 en el extremo amino terminal de su CP se ha originado de modo natural y debe suponer alguna ventaja adaptativa para el virus.
2. Los aislados PPV 3.3 y PPV R3-NAT son capaces de transmitirse cuando en ensayos *in vitro* en el proceso interviene un HC funcional de otro potyvirus (PVY), por lo que la CP de estos virus permanece activa a pesar de la delección de quince aminoácidos que presenta en su extremo amino terminal.
3. La unión del HC de PVY 0AT así como de PVY N a la CP de PPV 3.3 podría ocurrir por el reconocimiento de la secuencia DAL de la CP o bien por la unión del HC heterólogo a otro motivo diferente (un segundo DAG) que podría verse favorecido espacialmente con la delección de la región amino terminal de la CP.
4. Se ha demostrado en ensayos *in vitro* la interacción entre la CP y el HC de PPV 3.3. Aunque estos resultados son preliminares parecerían indicar que, al menos en condiciones artificiales, la unión entre ambas proteínas tiene lugar.
5. El hecho de que la CP y el HC de PPV 3.3 sean capaces de interactuar *in vitro* apunta a la posibilidad de una falta de interacción entre dicho HC y el estilete del pulgón que determinaría la no transmisibilidad de este aislado.
6. La secuencia consenso del HC del aislado PPV 3.3 no presenta ninguna diferencia con respecto a la del HC del aislado transmisible PPV 5.15, si bien los clones obtenidos para ambos aislados reflejan una alta heterogeneidad poblacional de secuencia.
7. A la vista de las secuencias obtenidas con los diferentes clones que contienen la región codificadora del HC de PPV 3.3 y PPV 5.15, ambos aislados tienen estructura de cuasiespecie en planta.
8. Las mutaciones observadas en la secuencia codificadora del HC del clon p1HC3.3, y pensamos que en especial la sustitución G₆₅₀S, determinan la no funcionalidad de dicho HC en alguno o varios de los papeles que esta proteína desempeña en el proceso de infectividad, de modo que genomas de PPV que contienen esta secuencia no infectan planta.
9. Las dos únicas diferencias existentes entre las proteínas HC de PPV Rankovik (clon p1C) y PPV 5.15 determinan la baja eficiencia del HC del aislado Rankovik en transmisión de virus por pulgones en experimentos planta a planta.

10. El HC de los aislados PVY 0AT y PVY 0NAT modificado en los aminoácidos en posición 2 y 3 e incluidos en un contexto de genoma de PPV permiten la infectividad de las construcciones quiméricas pero no la transmisión por pulgones de las mismas. Pensamos que los cambios aminoacídicos en el extremo amino de estos HC puede ser el responsable de este comportamiento.
11. El único aminoácido que la construcción pQ-0NAT presenta con respecto a pQ-0AT y que afecta al motivo conservado KIRC podría tener efecto sobre la acumulación de este "virus" quimérico en planta, que muestran síntomas con retraso respecto a las plantas inoculadas con pQ-0AT o con pIC.
12. El proceso de purificación parcial del HC de potyvirus puede ser empleado en la purificación del HC del aislado PPV, no conseguido hasta la fecha.

BIBLIOGRAFÍA

- Acuña, R. (1993). Outbreaks of plum pox virus in Chile. Abstracts OEPP/EPPO Conference on Plum Pox, Burdeos.
- Adams, A.N. (1978). The detection of plum pox virus in *Prunus* species by enzyme-linked immunosorbent assay. *Annals of Applied Biology* 90, 215-221.
- Adams, A.N., Guise, C.M. y Crossley, S.J. (1999). Plum pox virus detection in dormant plum trees by PCR and ELISA. *Plant Pathology* 48, 240-244.
- Allison, R.F., Dougherty, W.G., Parks, T.D., Johnston, R.E., Kelly, M. y Armstrong, F.B. (1985). Biochemical analysis of the capsid protein gene and capsid protein of tobacco etch virus: N-terminal amino acids are located on the virion's surface. *Virology* 147, 309-316.
- Ammar, E.D., Järlfors, U. y Pirone, T.P. (1994). Association of potyvirus helper component protein with virions and the cuticle lining the maxillary food canal and foregut of an aphid vector. *Phytopathology* 84, 1054-1060.
- Anandalakshmi, R., Pruss, G.J., Ge, X., Marathe, R., Smith, T.H. y Vance, V.B. (1998). A viral suppressor of gene silencing in plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95, 13079-13084.
- Andersen, K. y Johansen, I.E. (1998). A single conserved amino acid in the coat protein gene of pea seed-borne mosaic potyvirus modulates the ability of the virus to move systemically in *Chenopodium quinoa*. *Virology* 241, 304-311.
- Arbatova, J., Lehto, K., Pehu, E. y Pehu, T. (1998). Localization of the P1 protein of potato Y potyvirus in association with cytoplasmic inclusion bodies and in the cytoplasm of infected cells. *Journal of General Virology* 79, 2319-2323.
- Atreya, C.D., Atreya, P.L., Thornbury, D.W. y Pirone, T.P. (1992). Site-directed mutations in the potyvirus HC-Pro gene affect helper component activity, virus accumulation, and symptom expression in infected tobacco plants. *Virology* 191, 106-111.
- Atreya, C.D. y Pirone, T.P. (1993). Mutational analysis of the helper component-proteinase gene of a potyvirus: Effects of amino acid substitutions, deletions, and gene replacement on virulence and aphid transmissibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 90, 11919-11923.
- Atreya, C.D., Raccah, B. y Pirone, T.P. (1990). A point mutation in the coat protein abolishes aphid transmissibility of a potyvirus. *Virology* 178, 161-165.
- Atreya, P.L., Atreya, C.D. y Pirone, T.P. (1991). Amino acid substitutions in the coat protein result in loss of insect transmissibility of a plant virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 88, 7887-7891.
- Atreya, P.L., López-Moya, J.J., Chu, M., Atreya, C.D. y Pirone, T.P. (1995). Mutational analysis of the coat protein N-terminal amino acids involved in potyvirus transmission by aphids. *Journal of General Virology* 76, 265-270.

- Audergon, J.M., Dosba, F., Karayiannis, I. y Dicenta, F. (1994). Amélioration de labricotier pour la résistance á la sharka. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 24, 741-748.
- Avinet, L., Hermoso de Mendoza, A. y Llácer, G. (1989). Especies dominantes y curvas de vuelo de pulgones (Homoptera, Aphidinea) en campos de frutales de hueso españoles. *Investigación Agraria: Producción y Protección Vegetal* 4, 283-298.
- Badge, J., Robinson, D.J., Brunt, A.A. y Foster, G.D. (1997). 3'-Terminal sequences of the RNA genomes of narcissus latent and Maclura mosaic viruses suggest that they represent a new genus of the *Potyviridae*. *Journal of General Virology* 78, 253-257.
- Balan, V., Ivascu, A. y Toma, S. (1995). Susceptibility of apricot, nectarine and peach cultivars and hybrids to plum pox virus. *Acta Horticulturae* 386, 299-305.
- Barnett, O.W. (1991). *Potyviridae*, a proposed family of plant viruses. *Archives of Virology* 118, 139-141.
- Barnett, O.W. (1992). A summary of potyvirus taxonomy and definitions. En: Barnett, O.W. (ed.), *Potyvirus Taxonomy*. Springer, Wien and New York (*Archives of Virology* -supplement- 5)
- Baunoch, D.A., Das, P. y Hari, V. (1990). Potato virus Y helper component is associated with amorphous inclusions. *Journal of General Virology* 71, 2479-2482.
- Berg, J.M. (1990). Zinc fingers and other metal-binding domains. *Journal of Biological Chemistry* 265, 6513-6516.
- Berger, P.H. y Pirone, T.P. (1986). The effect of helper component on the uptake and localization of potyviruses in *Myzus persicae*. *Virology* 153, 256-261.
- Bernhard, R., Marénaud, C. y Sutic, D. (1969). Le pêcheur GF 305 indicateur polyvalent des virus des espèces à noyau. *Annals of Phytopathology* 1, 603-617.
- Blanc, S., Ammar, E.D., García-Lampasona, S., Dolja, V.V., Llave, C., Baker, J. y Pirone, T.P. (1998). Mutations in the potyvirus helper component protein: Effects on interactions with virions and aphid stylets. *Journal of General Virology* 79, 3119-3122.
- Blanc, S., López Moya, J.J., Wang, R., García Lampasona, S., Thornbury, D.W. y Pirone, T.P. (1997). A specific interaction between coat protein and helper component correlates with aphid transmission of a potyvirus. *Virology* 231, 141-147.
- Bousalem, M., Candresse, T., Quiot-Douine, L. y Quiot, J.B. (1994). Corrélation entre trois techniques permettant de différencier les isolates du plum pox potyvirus. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 24, 651-656.

- Brantley, J.D. y Hunt, A.G. (1993). The N-terminal protein of the polyprotein encoded by the potyvirus tobacco vein mottling virus is an RNA-binding protein. *Journal of General Virology* 74, 1157-1162.
- Brigneti, G., Voinnet, O., Li, W.X., Ji, L.H., Ding, S.W. y Baulcome, D. (1998). Viral pathogenecity determinants are suppressors of trnasgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO Journal* 17, 6739-6746.
- Bryan, G.T., Gardner, R.C. y Forster, R.L.S. (1992). Nucleotide sequence of the coat protein gene of a strain of clover yellow vein virus from New Zealand: conservation of a stem-loop structure in the 3' region of potyviruses. *Archives of Virology* 124, 133-146.
- Cambra, M., Asensio, M., Gorris, M.T., Pérez, E., Camarasa, E., García, J.A., López-Moya, J.J., López-Abella, D., Vela, C. y Sanz, A. (1994). Detection of plum pox potyvirus using monoclonal antibodies to structural proteins. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 24, 569-577.
- Cambra, M., Camarasa, E., Gorris, M.T., Garnsey, S.M. y Carbonell, E. (1991). Comparison of different immunosorbent assays for citrus tristeza virus (CTV) using CTV-specific monoclonal and polyclonal antibodies. En: *Proceedings of the 11 th Conference of the International Organization of Citrus Virologists, IOCV Riverside*, 38-45.
- Candresse, T., Macquaire, G., Lanneau, M., Bousalem, M., Quiot-Douine, L., Quiot, J.B., Dunez, J. (1995). Analysis of plum pox virus variability and developement of strain-specific PCR assays. *Acta Horticulturae* 386, 357-369.
- Candresse, T., Macquaire, G., Lanneau, M., Bousalem, M., Wetzels, T., Quiot-Douine, L., Quiot, J.B. y Dunez, J. (1994). Detection of plum pox potyvirus and analysis of its molecular variability using immunocapture-PCR. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 24, 585-594.
- Canto, T., Ellis, P., Bowler, G. y López-Abella, D. (1995a). Production of monoclonal antibodies to potato virus Y helper component-protease and their use for strain differentiation. *Plant Disease* 79, 234-237.
- Canto, T., López-Moya, J.J., Serra-Yoldi, M.T., Díaz-Ruiz, J.R. y López-Abella, D. (1995b). Different helper component mutations associated with lack of aphid transmissibility in two isolates of potato virus Y. *Phytopathology* 85, 1519-1524.
- Carrington, J.C., Cary, S.M., Parks, T.D. y Dougherty, W.G. (1989a). A second proteinase encoded by a plant potyvirus genome. *EMBO Journal* 8, 365-370.
- Carrington, J.C. y Dougherty, W.G. (1987). Small nuclear inclusion protein encoded by a plant potyvirus genome is a protease. *Journal of Virology* 61, 2540-2548.
- Carrington J.C. y Dougherty, W.G. (1988). A viral cleavage site cassette: Identification of amino acid sequences required for tobacco etch virus

- polyprotein processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 85, 3391-3395.
- Carrington, J.C. y Freed, D.D. (1990). Cap-independent enhancement of translation by a plant potyvirus 5' nontranslated region. *Journal of Virology* 64, 1590-1597.
- Carrington, J.C., Freed, D.D. y Oh, C.S. (1990). Expression of potyviral polyproteins in transgenic plants reveals three proteolytic activities required for complete processing. *EMBO Journal* 9, 1347-1353.
- Carrington, J.C., Freed, D.D. y Sanders, T.C. (1989b). Autocatalytic processing of the potyvirus helper component proteinase in *Escherichia coli* and *in vitro*. *Journal of Virology* 63, 4459-4463.
- Carrington, J.C., Haldeman, R., Dolja, V.V. y Restrepo, M.A. (1993). Internal cleavage and trans-proteolytic activities of the VPg-proteinase (NIa) of tobacco etch potyvirus *in vivo*. *Journal of Virology* 67, 6995-7000.
- Carrington, J.C., Jensen, P.E. y Schaad, M.C. (1998). Genetic evidence for an essential role for potyvirus CI protein in cell-to-cell movement. *The Plant Journal* 14, 393-400.
- Crescenzi, A., Nuzzaci, M., Levy, L., Piazzolla, P. y Hadidi, A. (1995). Plum pox virus (PPV) in sweet cherry. *Acta Horticulturae* 386, 219-225.
- Cronin, S., Verchot, J., Haldeman-Cahill, R., Schaad, M.C. y Carrington, J.C. (1995). Long-distance movement factor: A transport function of the potyvirus helper component proteinase. *Plant Cell* 7, 549-559.
- Christie, R.G. y Edwardson, J.R. (1977). Light and electron microscopy of plant virus inclusions. *Fla. Agr. Exp. Stat. Monograph* 9, 157.
- Chu, M., López Moya, J.J., Llave Correas, C. y Pirone, T.P. (1997). Two separate regions in the genome of tobacco etch virus contain determinants of the wilting response of tabasco pepper. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10, 472-480.
- De Mejía, M.V.G., Hiebert, E., Purcifull, D.E., Thornbury, D.W. y Pirone, T.P. (1985). Identification of potyviral amorphous inclusion protein as a nonstructural, virus-specific protein related to helper component. *Virology* 142, 34-43.
- Dixon, A.F.G. (1985). Aphid ecology. Backie. Glasgow and London. 157 p.
- Dolja, V.V. y Carrington, J.C. (1992). Evolution of positive-strand RNA viruses. 3, 315-326.
- Dolja, V.V., Haldeman, R., Robertson, N.L., Dougherty, W.G. y Carrington, J.C. (1994). Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of tobacco etch potyvirus in plants. *EMBO Journal* 12, 1482-1491.
- Dolja, V.V., Haldeman-Cahill, R., Montgomery, A.E., Vandenbosch, K.A. y Carrington, J.C. (1995). Capsid protein determinants involved in cell to cell

- and long distance movement of tobacco etch potyvirus. *Virology* 206, 1007-1016.
- Dolja, V.V., McBride, H.J. y Carrington, J.C. (1992). Tagging of plant potyvirus replication and movement by insertion of β -glucoronidase into the viral polyprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 89, 10208-10212.
- Domier, L.L., Shaw, J.G. y Rhoads, R.E. (1987). Potyviral proteins share amino acid sequence homology with picorna-, como-, and caulimoviral proteins. *Virology* 158, 20-27.
- Dosba, F., Lansac, M. Audergon, J.M., Massonié, G. y Maison, P. (1988). Tolerance to plum pox virus in apricot. *Acta Horticulturae* 235, 275-281.
- Dosba, F., Lansac, M., Pecheur, G., Teyssier, B., Piquemal, J.P. y Michel, M. (1996). Plum pox virus detection by ELISA in peach and apricot trees at different growing stages. *Acta Horticulturae* 193, 187-191.
- Dosba, F., Maison, P., Lansac, M. y Massonié, G. (1987). Experimental transmission of plum pox virus (PPV) to *Prunus mahaleb* and *Prunus avium*. *Journal of Phytopathology* 120, 199-204.
- Dougherty, W.G., Carrington, J.C., Cary, S.M. y Parks, T.D. (1988). Biochemical and mutational analysis of a plant virus polyprotein cleavage site. *EMBO Journal* 7, 1281-1287.
- Dougherty, W.G., Cary, S.M. y Parks, T.D. (1989). Molecular genetic analysis of a plant virus polyprotein cleavage site: A model. *Virology* 171, 356-364.
- Dougherty, W.G. y Hiebert, E. (1980). Translation of potyvirus RNA in a rabbit reticulocyte lysate: Identification of nuclear inclusion proteins as products of tobacco etch virus RNA translation and cylindrical inclusion protein as product of the potyvirus genome. *Virology* 104, 174-182.
- Dougherty, W.G. y Parks, T.D. (1989). Molecular genetic and biochemical evidence for the involvement of the heptapeptide cleavage sequence in determining the reaction profile at two tobacco etch virus cleavage sites in cell-free assays. *Virology* 172, 145-155.
- Dougherty, W.G. y Parks, T.D. (1991). Post-translational processing of the tobacco etch virus 49-kDa small nuclear inclusion polyprotein: Identification of an internal cleavage site and delimitation of Vpg and proteinase domains. *Virology* 183, 449-456.
- Dougherty, W.G., Willis, L. y Johnston, R.E. (1985). Topographic analysis of tobacco etch virus capsid protein epitopes. *Virology* 144, 66-72.
- Eastop, V.F. (1977). Worldwide importance of aphids as virus vectors. En: *Aphid as virus vectors*, pp 361-383. Eds. K.F. Harris y K. Maramorosch. Academic press, New York.
- Edwardson, J.R. (1992). Inclusion bodies. *Archives of Virology Supplement* 5, 25-30.

- Ehlers, U., y Paul, H.L. (1986). Characterization of the coat protein of different types of Barley Yellow Mosaic Virus by polyacrylamide gel electrophoresis and electro-blot immunoassay. *Journal of Phytopathology* 115, 294-304.
- EPPO-CABI (1992). Plum Pox Potyvirus. En: *Quarantine Pest for Europe*. CABI, Wallingford, 922-927.
- Erdős, Z., Keret, M.M., Nyúgio, E., Kölber, M. y Németh, M. (1995). Reaction of hungarian apricot cultivars and hybrids exposed to high PPV infection. *Acta Horticulturae* 386, 298.
- Fellers, J., Wan, J., Hong, Y., Collins, G.B. y Hunt A.G. (1998). *In vitro* interactions between a potyvirus-encoded, genome-linked protein and RNA-dependent RNA polymerase. *Journal of General Virology* 79, 2043-2049.
- Forbes, A.R. (1977). *The mouthparts and feeding mechanism of aphids*. En: *Aphid as virus vectors*, pp 361-383. Eds. K.F. Harris y K. Maramorosch. Academic press, New York.
- Flasinski, S. y Cassidy, B.G. (1998). Potyvirus aphid transmission requires helper component and homologous coat protein for maximal efficiency. *Archives of Virology* 143, 2159-2172.
- Francki, R.I.B., Fauquet, C.M., Knudson, D.L. y Brown, F. (eds.) (1991). Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Archives of Virology Supplement* 2, 450 pp.
- García, J.A., Laín, S., Cervera, M.T., Riechmann, J.L. y Martín, M.T. (1990). Mutational analysis of plum pox potyvirus processing by the NIa protease in *Escherichia coli*. *Journal of General Virology* 71, 2773-2779.
- García, J.A., Riechmann, J.L. y Laín, S. (1989). Proteolytic activity of the plum pox potyvirus NIa-like protein in *Escherichia coli*. *Virology* 170, 362-369.
- Giachetti, C. y Semler, B.L. (1991). Role of a viral membrane polypeptide in strand-specific initiation of poliovirus RNA synthesis. *Journal of Virology* 65, 2647-2654.
- Goldbach, R. (1987). Genome similarities between plant and animal RNA viruses. *Microbiological Sciences*, 4, 197-202.
- Gorbalenya, A.E. y Koonin, E.V. (1989). Viral proteins containing the purine NTP-binding sequence pattern. *Nucleic Acids Research* 17, 8413-8439.
- Gorbalenya, A.E. y Koonin, E.V. (1993). Helicases: Amino acid sequence comparisons and structure-function relationship. *Current Opinion in Structural Biology* 3, 419-429.
- Govier, D.A. y Kassanis, B. (1974). Evidence that a component other than the virus particle is needed for aphid transmission of potato virus Y. *Virology* 57, 285-286.

- Govier, D.A., Kassanis, B. y Pirone, T.P. (1977). Partial purification and characterization of the potato virus Y helper component. *Virology* 78, 306-314.
- Granier, F., Durand-Tardif, M., Casse-Delbart, F., Lecoq, H. y Robaglia, C. (1993). Mutations in zucchini yellow mosaic virus helper component protein associated with loss of aphid transmissibility. *Journal of General Virology* 74, 2737-2742.
- Gray, S.M. (1996). Plant virus proteins involved in natural vector transmission. *Trends in Microbiology* 4, 259-264.
- Grumet, R., Bada, R. y Hammar, S. (1992). Analysis of the zucchini mosaic virus (ZYMV) potyviral helper component, possible identification of an aphid-interaction domain. *Phytopathology* 82, 1176.
- Guo, H.S., Cervera, M.T. y García, J.A. (1998). Plum pox potyvirus resistance associated to transgene silencing that can be stabilized after different number of plant generations. *Gene* 206, 263-272.
- Guo, H.S. y García, J.A. (1997). Delayed resistance to plum pox potyvirus mediated by a mutated RNA replicase gene: Involvement of a gene-silencing mechanism. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10, 160-170.
- Guo, H.S., López-Moya, J.J. y García, J.A. (1999). Mitotic stability of infection-induced resistance to plum pox potyvirus associated with transgene silencing and DNA methylation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12, 103-111.
- Haldeman-Cahill, R., Darós, J.A. y Carrington, J.A. (1998). Secondary structures in the capsid protein sequence and 3' nontranslated region involved in amplification of the tobacco etch virus genome. *Journal of Virology* 72, 4072-4079.
- Hari, V. (1981). The RNA of tobacco etch virus: further characterization and detection of protein linked to RNA. *Virology* 112, 391-399.
- Hari, V., Siegel, A., Rozek, D. y Timberlake, W.E. (1979). The RNA of tobacco etch virus contains poly(A). *Virology* 92, 568-571.
- Harris, K.F. (1977). *An ingestion-egestion hypothesis of noncirculative virus transmission*. En *Aphids as virus vectors*, pp 165-220. Ed. K. Maramorosch. Academic Press. New York.
- Harris, K.F. (1991). *Aphid transmission of plant viruses*. En *Plant Viruses*, vol II, pp 177-204. Pathology. Ed. C.L. Mandahar, CRC Press.
- Hellmann, G.M., Shaw, J.G. y Rhoads, R.E. (1988). *In vitro* analysis of tobacco vein mottling virus NIa cistron: Evidence for a virus-encoded protease. *Virology* 163, 554-562.
- Hellmann, G.M., Thornbury, D.W., Hiebert, E., Shaw, J.G., Pirone, T.P. y Rhoads, R.E. (1983). Cell-free translation of tobacco vein mottling virus RNA. II. Immunoprecipitation of products by antisera to cylindrical inclusions, nuclear inclusion, and helper component proteins. *Virology* 124, 434-444.

- Hollings, M. y Brunt, A.A. (1981). *Potyvirus group*. En CMI/AAB Descriptions of plant viruses. N° 245.
- Hong, Y. y Hunt, A.G. (1996). RNA polymerase activity catalyzed by a potyvirus-encoded RNA-dependent RNA polymerase. *Virology* 226, 146-151.
- Huet, H., Gal-On, A., Meir, E., Lecoq, H. y Raccach, B. (1994). Mutations in the helper component protease of zucchini yellow mosaic virus affect its ability to mediate aphid transmissibility. *Journal of General Virology* 75, 1407-1414.
- Jansen, R.W., Siegl, G. y Lemon, S.M. (1990). Molecular epidemiology of human hepatitis A virus defined by an antigen-capture polymerase chain reaction method. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 87, 2867-2871.
- Jacquet, C., Delecolle, B., Raccach, B., Lecoq, H., Dunez, J. y Ravelonandro, M. (1998). Use of modified plum pox virus coat protein genes developed to limit heteroencapsidation-associated risks in transgenic plant. *Journal of General Virology* 79, 1509-1517.
- Johnson, K.L. y Sarnow, P. (1991). Three poliovirus 2B mutants exhibit non-complementable defects in viral RNA amplification and display dosage-dependent dominance over wild-type poliovirus. *Journal of Virology* 65, 4341-4349.
- Kalashyan, Yu.Al., Bilkey, N.D., Verderevskaya, T.D., Rubina, E.V. (1994). Plum pox potyvirus on sour cherry in Moldova. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 24, 645-649.
- Karayiannis, I. y Mainou, A. (1993). Plum pox resistance in apricots. *OEPP/EPPO Conference on Plum Pox*, Burdeos 64-65.
- Kassanis, B. (1961). The transmission of potato aucuba mosaic virus by aphids from plants also infected by potato viruses A or Y. *Virology* 13, 93-97.
- Kassanis, B. y Govier, D.A. (1971a). New evidence on the mechanism of aphid transmission of potato C and potato aucuba mosaic viruses. *Journal of General Virology* 10, 99-101.
- Kassanis, B. y Govier, D.A. (1971b). The role of the helper virus in aphid transmission of potato aucuba mosaic virus and potato virus C. *Journal of General Virology* 13, 221-228.
- Kasschau, K.D. y Carrington, J.C. (1995). Requirement for HC-Pro processing during genome amplification of tobacco etch potyvirus. *Virology* 209, 268-273.
- Kasschau, K.D. y Carrington, J.C. (1998). A counterdefensive strategy of plant viruses: Suppression of post-transcriptional gene silencing. *Cell* 95, 461-470.
- Kasschau, K.D., Cronin, S. y Carrington, J.C. (1997). Genome amplification and long-distance movement functions associated with the central domain of tobacco etch potyvirus helper component-proteinase. *Virology* 228, 251-262.
- Kegler, H. y Schade, C. (1971). Plum pox virus. C.M.I./A.A.B. *Description of Plant Viruses* N° 70.

- Kennedy, J.S., Day, M.F. y Eastop, V.F. (1962). *A conspectus of aphid as vector of plant viruses*. Commonwealth Institute of Entomology. London
- Kerlan, C. y Dunez, J. (1979). Différenciation biologique et sérologique de souches du virus de la Sharka. *Annals of Phytopathology* 11, 241-250.
- Kerlan, C., Mille, B. y Dunez, J. (1981). Immunosorbent electron microscopy for detecting apple chlorotic leaf spot and plum pox viruses. *Phytopathology* 71, 400-404.
- Kim, D.H., Han, J.S., Lew, J., Kim, S.S., Kang, B.H., Hwang, D.C., Jang, D.S., Kim, W., Song, B.D. y Choi, K.Y. (1998). Effects of mutations in the C-terminal region of NIa protease on cis-cleavage between NIa and NIb. *Virology* 241, 94-100.
- Kim, D.H., Hwang, D.C., Kang, b.H., Lew, J., Han, J., Song, B.D. y Choi, K.Y. (1996). Effects of internal cleavages and mutations in the C-terminal region of NIa protease of turnip mosaic potyvirus on the catalytic activity. *Virology* 226, 183-190.
- Klein, P.G., Klein, R.R., Rodriguez Cerezo, E., Hunt, A.G. y Shaw, J.G. (1994). Mutational analysis of the tobacco vein mottling virus genome. *Virology* 204, 759-769.
- Knuhtsen, H., Hiebert, E. y Purcifull, D.E. (1974). Partial purification and some properties of tobacco etch virus induced intranuclear inclusions. *Virology* 61, 200-209.
- Korschineck, I., Himmler, G., Sagl, R., Steinkellner, J. y Katinger, H.W.D. (1991). A PCR membrane spot assay for the detection of plum pox virus RNA in bark of infected trees. *Journal of Virological Methods* 31, 139-146.
- Labonne, G. y Lauriant, F. (1991). Evaluation du nombre de pucerons qui atterrissent sur un arbre en relation avec la dissémination du plum pox virus. *Phytopathol. Medit.* 30, 167-172.
- Labonne, G., Lauriant, F., Yvon, M. y Quiot, J.B. (1994). Dissémination du plum pox potyvirus par les pucerons: analyse des vecteurs potentiels du virus dans un verger d'abricotiers. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 24, 681-690.
- Labonne, G., Yvon, M., Quiot, J.B., Avinent, L. y Llácer, G. (1995). Aphids as potential vectors of plum pox virus: comparison of methods of testing an epidemiological consequences. *Acta Horticulturae* 386, 207-218.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Láin, S., Riechmann, J.L. y García, J.A. (1989). The complete nucleotide sequence of plum pox potyvirus RNA. *Virus Research* 13, 157-172.
- Láin, S., Riechmann, J.L. y García, J.A. (1990). RNA helicase: A novel activity associated with a protein encoded by a positive strand RNA virus. *Nucleic Acids Research* 18, 7003-7006.

- Laín, S., Riechmann, J.L. y García, J.A. (1991). Novel catalytic activity associated with positive-strand RNA virus infection: nucleic acid-stimulated ATPase activity of the plum poxyvirus helicase-like protein. *Journal of Virology* 65, 1-6.
- Laín, S., Riechmann, J.L., Méndez, E. y García, J.A. (1988). Nucleotide sequence of the 3' terminal region of plum poxy virus RNA. *Virus Research* 10, 325-342.
- Langenberg, W.G. (1986). Virus protein associated with cylindrical inclusions of two viruses that infect wheat. *Journal of General Virology* 67, 1161-1168.
- Lecoq, H., Bourdin, D., Raccach, B., Hiebert, E. y Purcifull, D.E. (1991). Characterization of a zucchini yellow mosaic virus isolate with deficient helper component. *Phytopathology* 81, 1087-1091.
- Legavre, T., Maia, I.G., Casse-Delbart, F. y Bernardi, F. (1996). Switches in the mode of transmission select for or against a poorly aphid-transmissible strain of potato virus Y with reduced helper component and virus accumulation. *Journal of General Virology* 77, 1343-1347.
- Lessemann, D.E. (1988). *Cytopathology*. En *The plant viruses*, vol. 4. The filamentous plant viruses pp 179-235. Ed R.G. Milne. Plenum Press, New York, London.
- Levy, L. y Hadidi, A. (1991). Development of a reverse transcription/polymerase chain reaction assay for the detection of plum poxy virus from microgram quantities of total nucleic acids. *Phytopathology* 81, 10, 1154 (abstract).
- Levy, L., Kolber, M., Tokes, G., Németh, M. y Hadidi, A. (1995). 3'-non coding region RT-PCR detection and molecular hybridization of plum poxy virus in anthers of infected stone. *Acta Horticulturae* 386, 331-339.
- Li, X.H. y Carrington, J.C. (1993). Nuclear transport of tobacco etch potyviral RNA-dependent RNA polymerase is highly sensitive to sequence alterations. *Virology* 193, 951-958.
- Li, X.H., Valdez, P., Olvera, R.E. y Carrington, J.C. (1997). Functions of the tobacco etch virus RNA polymerase (NIb): Subcellular transport and protein-protein interactions with VPg/proteinase (Nia). *Journal of Virology* 71, 1598-1607.
- Logemann, J., Schell, J. y Willmitzer, L. (1987). Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Analytical Biochemistry* 163, 16-20.
- Lomonosoff, G.P. (1995). Pathogen-derived resistance to plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33, 323-343.
- López Abella, D. y Bradley, R.H.E. (1969). Aphids may not acquire and transmit styletborne viruses while probing intercellularly. *Virology* 39, 338-342.
- López Abella, D., Bradley, R.H.E. y Harris, K.F. (1988). *Correlation between stylet paths made during superficial probing and the ability of aphids to transmit non persistent viruses*. En *Advances in Disease Vector Research*, vol 5, pp 251-287. Ed. K.F. Harris. Springer Verlag, New York.

- López Abella, D., Pirone, T.P., Mernaugh, R.E. y Johnson, M.C. (1981). Effects of fixation and helper component on the detection of potato virus Y in alimentary tract extracts of *Myzus persicae*. *Phytopathology* 71, 807-809.
- López Moya, J.J., (1993). Estudio de la transmisión por áfidos del virus de la sharka, plum pox virus (PPV). *Tesis doctoral*.
- López Moya, J.J. y López Abella, D. (1996). *Transmisión de virus de plantas por insectos*. En Patología Vegetal vol I, pp 275-300. Eds. G. Llácer, M.M. López, A. Trapero y A. Bello. Sociedad Española de Fitopatología.
- López Moya, J.J. Pirone, T.P. (1998). Charge changes near the N terminus of the coat protein of two potyviruses affect virus movement. *Journal of General Virology* 79, 161-165.
- López Moya, J.J. Pirone, T.P. (1999).
- López Moya, J.J., Sanz, A., Cambra, M., Gorris, M.T., Anaya, C., Miguët, J.G., Cores, E. y López Abella, D. (1994). Production and characterization of monoclonal antibodies to plum pox virus and their use in differentiation of Mediterranean isolates. *Archives of Virology* 135, 293-304.
- Llácer, G., Cambra, M. y Laviña, A. (1985). Detección y primeros estudios del virus de la Sharka en España. *Anales INIA. Serie Agrícola* 28, 157-166
- Llave, C. (1999). Análisis molecular de los mecanismos de transmisión de potyvirus por pulgones. *Tesis doctoral*.
- Mahajan, S., Dolja, V.V. y Carrington, J.C. (1996). Roles of the sequence encoding tobacco etch virus capsid protein in genome amplification: Requirements for the translation process and a *cis*-active element. *Journal of Virology* 70, 4370-4379.
- Maia, I.G. y Bernardi, F. (1996). Nucleic acid-binding properties of bacterially expressed potato virus Y helper component-proteinase. *Journal of General Virology* 77, 869-877.
- Maia, I.G., Haenni, A.L. y Bernardi, F. (1996). Potyviral HC-Pro: A multifunctional protein. *Journal of General Virology* 77, 1335-1341.
- Marco, S. (1993). Incidence of non persistently transmitted viruses in peppers with whitesash, oil and insecticide, alone or combined. *Plant Disease* 77, 697-704.
- Martín, B., Collar, J.L., Tjallingii, W.F. y Fereres, A. (1997). Intracellular ingestion and salivation by aphids may cause the acquisition and inoculation of non-persistently transmitted plant viruses. *Journal of General Virology* 78, 2701-2705.
- Massonié, G. y Maison, P. (1986). Investigations on the resistance of peach varieties to aphid transmission of plum pox virus. *Acta Horticulturae* 193, 207-211.
- Matthews, R.E.F. (1991). *Plant Virology*. Academic Press, San Diego, California.

- Mavankal, G. y Rhoads, R. (1991). *In vitro* cleavage at or near the N-terminus of the helper component protein in the tobacco vein mottling virus polyprotein. *Virology* 185, 721-731.
- Merits, A., Guo, D. y Saarma, M. (1998). VPg, coat protein and five non-structural proteins of potato A potyvirus bind RNA in a sequence-unspecific manner. *Journal of General Virology* 79, 3123-3127.
- Milne, R.G. (1988). The economic impact of filamentous viruses. En: Milne R.G. (ed), *The Plant Viruses: The Filamentous Plant Viruses*, Vol 4. Plenum Press, New York and London, 3-50.
- Mowat, W.P., Dawson, S., Duncan, G.H. y Robinson, D.J. (1991). Narcissus latent, a virus with filamentous particles and a novel combination properties. *Annals of Applied Biology* 119, 31-46.
- Murphy, J.F., Klein, P.G., Hunt, A.G. y Shaw, J.G. (1996). Replacement of the Tyr residue that links a potyviral VPg to the viral RNA is lethal. *Virology* 220, 535-538.
- Murphy, J.F., Rhoads, R.E., Hunt, A.G. y Shaw, J.G. (1990). The VPg of tobacco etch virus RNA is the 49-kDa proteinase or the N-terminal 24-kDa part of the proteinase. *Virology* 178, 285-288.
- Németh, M. (1986). Virus, mycoplasma and rickettsia diseases of fruit trees. *Martinus Nijhoff publishers, The Nederland and Akademiai Kiadó, Hungary*. 841 p.
- Németh, M. (1994). History and importance of plum pox in stone fruit production. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 24, 525-536.
- Nicolas, O., Dunnington, S.W., Gotow, L.F., Pirone, T.P. y Hellmann, G.M. (1997). Variations in the VPg protein allow a potyvirus to overcome *va* gene resistance in tobacco. *Virology* 237, 452-459.
- Oh, C.S. y Carrington, J.C. (1989). Identification of essential residues in potyvirus proteinase HC-Pro by site directed mutagenesis. *Virology* 173, 692-699.
- Olmos, A., Cambra, M., Dasi, M.A., Candresse, T., Esteban, O., Gorris, M.T. y Asensio, M. (1997). Simultaneous detection and typing of plum pox potyvirus (PPV) isolates by heminested-PCR and PCR-ELISA. *Journal of Virological Methods* 68, 127-137.
- Olmos, A., Cambra, M., Esteban, O., Gorris, M.T. y Terrada, E. (1999). New device and method for capture, reverse trascription and nested PCR in a single closed-tube. *Nucleic Acids Research* 27, 1564-1565.
- Palkovics, L., Burgyan, J. Y Balazs, E. (1994). Sensitive non-radioactive nucleic acid hybridization assay for plum pox virus detection. *Research Virol* 145 (6), 387-392.
- Pasquini, G., Mazzei, M. y Barba, M. (1995). Improvement of detection of plum pox in stone fruits by ELISA. *Acta Horticulturae* 384, 543-547.

- Peng, Y., Kadoury, D., Gal-On, A., Huet, H., Wang, Y. y Raccah, B. (1998). Mutations in the HC-Pro gene of zucchini yellow mosaic potyvirus: Effects on aphid transmission and binding to purified virions. *Journal of General Virology* 79, 897-904.
- Pirone, T.P. (1977). Accessory factors in nonpersistent virus transmission. En: *Aphids as virus vectors*, K.F. Harris y K. Maramorosch, de. Academic Press, London, 221-235.
- Pirone, T.P. (1991). Viral genes and gene products that determine insect transmissibility. *Seminars in Virology* 2, 81-87.
- Pirone, T.P. y Kassanis, B. (1975). Polyaminoacid induced aphid transmission of plant viruses. *Journal of General Virology*, 29, 257-260.
- Pirone, T.P. y Thornbury, D.W. (1983). Role of virion and helper component in regulating aphid transmission of tobacco etch virus. *Phytopathology* 73, 872-875.
- Polák, J., Komínek, R., Jokes, M., Oukropec, I. y Krska, B. (1995). The evaluation of resistance of apricots to plum pox virus by ELISA and ISEM. *Acta Horticulturae* 386, 285-289.
- Pruss, G., Ge, X., Shi, X.M., Carrington, J.C. y Vance, V.B. (1997). Plant viral synergism: The potyviral genome encodes a broad-range pathogenecity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *The Plant Cell* 9, 859-868.
- Quemada, H., L'Hostis, B., Gonsalves, D., Reardon, I.M., Heinrikson, R., Hiebert, E.L., Sieu, L.C. y Slightom, J.L. (1990a). The nucleotide sequences of the 3'-terminal regions of papaya ringspot virus strains W and P. *Journal of General Virology* 71, 203-210.
- Quemada, H., Sieu, L.C., Siemieniak, D.R., Gonsalves, D. Y Slightom, J.L. (1990b). Watermelon mosaic virus II and zucchini yellow mosaic virus: cloning of 3'-terminal regions, nucleotide sequences, and phylogenetic comparisons. *Journal of General Virology* 71, 1451-1460.
- Restrepo Hartwig, M.A. y Carrington, J.C. (1992). Regulation of nuclear transport of a plant potyvirus protein by autoproteolysis. *Journal of Virology* 66, 5662-5666.
- Restrepo Hartwig, M.A. y Carrington, J.C. (1993). Differential processing of tobacco etch potyvirus polyproteins containing the 6-kDa protein. IX International Congress of Virology. Abstract W61-5. Glasgow, Scotland.
- Restrepo Hartwig, M.A. y Carrington, J.C. (1994). The tobacco etch potyvirus 6-kilodalton protein is membrane associated and involved in viral replication. *Journal of Virology* 68, 2388-2397.
- Restrepo, M.A., Freed, D.D. y Carrington, J.C. (1990). Nuclear transport of plant potyviral proteins. *The Plant Cell* 2, 987-998.

- Riechmann, J.L., Laín, S. y García, J.A. (1989). The genome-linked protein and 3' RNA sequence of plum pox potyvirus. *Journal of General Virology* 70, 2875-2879.
- Riechmann, J.L., Laín, S. y García, J.A. (1992). Highlights and prospects of Potyvirus molecular biology. *Journal of General Virology* 73, 1-16.
- Robaglia, C., Durand-Tardif, M., Tronchet, M., Boudazin, G., Astier-Manificier, S. y Casse Delbart, F. (1989). Nucleotide sequence of potato virus Y (N strain) genomic RNA. *Journal of General Virology* 70, 935-947.
- Roberts, I.M., Wang, D., Findlay, K. Y Maule, A.J. (1998). Ultrastructural and temporal observations of the potyvirus cylindrical inclusions (CIs) show that the CI protein acts transiently in aiding virus movement. *Virology* 245, 173-181.
- Rodríguez Cerezo, E., Ammar, E., Pirone, T.P. y Shaw, J.G. (1993). Association of the non-structural P3 viral protein with cylindrical inclusion in potyvirus-infected cells. *Journal of General Virology* 74, 1945-1949.
- Rodríguez Cerezo, E., Findlay, K., Shaw, J.G., Lomonossoff, G.P., Qiu, S.G., Linstead, P., Shanks, M. y Risco, C. (1997). The coat and cylindrical inclusion proteins of a potyvirus are associated with connections between plant cells. *Virology* 236, 296-306.
- Rodríguez Cerezo, E., Klein, P.G. y Shaw J. G. (1991). A determinant of disease symptom severity is located in the 3'-terminal noncoding region of the RNA of a plant virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 88, 9863-9867.
- Rodríguez Cerezo, E. y Shaw, J.G. (1991). Two newly-detected non-structural viral proteins in potyvirus-infected cells. *Virology* 185, 572-579.
- Rojas, M.R., Zerbini, F.M., Allison, R.F., Gilbertson, R.L. y Lucas, W.J. (1997). Capsid protein and helper component-proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins. *Virology* 237, 283-295.
- Roy, A.S. y Smith, I.M., (1994). Plum pox situation in Europe. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 24, 515-523.
- Rubio Huertos, M. (1978). Atlas on ultrastructure of plant tissues infected with viruses. CSIC, Madrid. 179 p.
- Rubio Huertos, M. y López Abella, D. (1966). Ultraestructura de células de pimiento infectadas con un virus y su localización en las mismas. *Microbiología Española* 19, 77-86.
- Sako, N. (1980). Loss of aphid-transmissibility of turnip mosaic virus. *Phytopathology* 70, 647-649.
- Salomon, R. y Bernardi, F. (1995). Inhibition of viral aphid transmission by the N-terminus of the maize dwarf mosaic virus coat protein. *Virology* 213, 676-679.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanford, J.C. y Johnson, S.A. (1985). The concept of parasite-derived resistance. Deriving resistance genes from the parasite's own genome. *Journal of Theoretical Biology* 113, 453-460.
- Schaad, M.C., Haldeman-Cahill, R., Cronin, S. y Carrington, J.C. (1996). Analysis of the VPg-Proteinase (NIa) encoded by tobacco etch potyvirus: Effects of mutation on subcellular transport, proteolytic processing, and genome amplification. *Journal of Virology* 70, 7039-7048.
- Schaad, M.C., Lellis, A.D. y Carrington, J.C. (1997). VPg of tobacco etch potyvirus is a host genotype-specific determinant for long-distance movement. *Journal of Virology* 71, 8624-8631.
- Shi, X.M., Miller, H., Verchot, J., Carrington, J.C., Vance, V.B. (1997). Mutations in the region encoding the central domain of helper component-proteinase (HC-Pro) eliminate potato virus X/potyviral synergism. *Virology* 231, 35-42.
- Shukla, D.D., Strike, P.M., Tracy, S.L., Gough, K.H. y Ward, C.W. (1988). The N and C termini of the coat protein of potyviruses are surface-located and the N terminus contains the major virus-specific epitopes. *Journal of General Virology* 69, 1497-1508.
- Shukla, D.D. y Ward, C.W. (1989). Structure of potyvirus coat proteins and its application in the taxonomy of the potyvirus group. *Advances in Virus Research* 36, 273-314.
- Siaw, M.F.E., Shahabuddin, M., Ballard, S., Shaw, J.G. y Rhoads, R.E. (1985). Identification of a protein covalently linked to the 5'-terminus of tobacco vein mottling virus RNA. *Virology* 142, 134-143.
- Sutic, D., Jordovic, M., Rankovic, M. y Festic, H. (1971). Comparative studies on some sharka (plum pox) virus isolates. *Annales de Phytopathologie* 3 (Supplement), 185-192.
- Tavert-Roudet, G., Ravelonandro, M., Bachelier, J.C. y Dunez, J. (1998). Transgenic *Nicotiana benthamiana* plants containing the P1 gene of plum pox virus are resistant to virus challenge. *European Journal of Plant Pathology* 104, 103-107.
- Thakur, P.O., Bharawaj, S.V., Garg, I.D., Khosla y K., Sharma, D.R. (1994). Plum pox virus on stone fruits from India. A new record. *Plant Disease* 9, 100-102.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. y Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673-4680.
- Thornbury, D.W., Hellmann, C.A., Rhoads, R.E. y Pirone, T.P. (1985). Purification and characterization of potyvirus helper component. *Virology* 144, 260-267.

- Thornbury, D.W., Patterson, C.A., Dessens, J.T. y Pirone, T.P. (1990). Comparative sequence of the helper component (HC) region of potato virus Y and a HC-defective strain, potato virus C. *Virology* 178, 573-578.
- Thornbury, D.W. y Pirone, T.P. (1983). Helper component of two potyviruses are serologically distinct. *Virology* 125, 487-490.
- Towbin, H., Staehlin, T. y Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of protein from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 76, 4350-4354.
- Turpen, T. (1989). Molecular cloning of a potato virus Y genome: nucleotide sequence homology in non-coding regions of potyviruses. *Journal of General Virology* 70, 1951-1960.
- Ullman, D.E., German, T.L., Sherwood, J.L., Westcot, D.M. y Cantone, F.A. (1993). Tosposvirus replication in insect vector cells: Immunocytochemical evidence that the nonstructural protein encoded by the sRNA of tomato spotted wilt tospovirus is present in thrips vector cells. *Phytopathology* 83, 456-463.
- Vance, V.B., Berger, P.H., Carrington, J.C., Hunt, A.G. y Shi, X.M. (1995). 5' proximal potyviral sequence mediate potato virus X/ potyviral synergistic disease in transgenic tobacco. *Virology* 206, 583-590.
- Verchot, J. y Carrington, J.C. (1995). Evidence that the potyvirus P1 proteinase functions in *trans* as an accessory factor for genome amplification. *Journal of Virology* 69, 3668-3674.
- Verchot, J., Herndon, K.L. y Carrington, J.C. (1992). Mutational analysis of the tobacco etch potyviral 35-kDa proteinase: Identification of essential residues and requirement for autoproteolysis. *Virology* 190, 298-306.
- Verchot, J., Koonin, E.V. y Carrington, J.C. (1991). The 35-kDa protein from the N-terminus of a potyviral poliprotein function as a third virus-encoded proteinase. *Virology* 185, 527-535.
- Ward, C.W. y Shukla, D.D. (1991). Taxonomy of potyviruses: Current problems and some solutions. *Intervirology* 32, 269-296.
- Webbs, S. y Linda, S.B. (1993). Effect of oild and insecticide on epidemics of potyviruses in watermelon in Florida. *Plant Disease* 77, 869-875.
- Wetzel, T., Candresse, T., Macquaire G., Ravelonandro, M. y Dunez, J. (1992). A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for plum pox potyvirus detection. *Journal of Virological Methods* 39, 27-37.
- Wetzel, T., Candresse, T., Ravelonandro, M., Delbos, R.P., Mazyad, H., Aboul-Ata, A.E. y Dunez, J. (1991). Nucleotide sequence of the 3'-terminal region of the RNA of the El Amar strain of Plum pox potyvirus. *Journal of General Virology* 72, 1741-1746.
- Wetzel, T., Tavert, G., Teycheney, P.Y., Ravelonandro, M., Candresse, T. y Dunez, J. (1990). Dot hybridization detection of plum pox virus using ³²P-labeled RNA

probes representing non-structural viral protein genes. *Journal of Virological Methods* 30, 161-172.

Wittner, A., Palkovics, L. y Balazs, E. (1998). *Nicotiana benthamiana* plants transformed with the plum pox virus helicase gene are resistant to virus infection. *Virus Research* 53, 97-103.

Wu, X y Shaw, J.G. (1998). Evidence that assembly of a potyvirus begins near the 5' terminus of the viral RNA. *Journal of General Virology* 79, 1525-1529.